

CICLO MESTRADO EM CIÊNCIAS DO MAR – RECURSOS MARINHOS

ESPECIALIZAÇÃO EM AQUACULTURA E PESCAS

**Ensaios com os rotíferos *Brachionus plicatilis*
(Müller, 1786), submetidos a diferentes dietas de
crescimento**

Vanessa Marina Ferreira Marujo

M

2016



Vanessa Marina Ferreira Marujo

Ensaio com os rotíferos *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786), submetidos a diferentes dietas de crescimento

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Ciências do Mar e Recursos Marinhos – Especialidade em Aquacultura e Pescas submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Carlos A. P. Andrade
Categoria – Técnico Superior Assessor Principal

Afiliação – Centro de Maricultura da Calheta
Coorientador (tutor) – Doutor Eduardo Jorge Sousa da Rocha

Categoria – Professor Catedrático
Afiliação – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

RESUMO

A alimentação em fases iniciais do ciclo de vida das larvas de peixes marinhos é um dos pontos críticos em aquacultura. Os rotíferos são organismos filtradores e como não apresentam preferências alimentares acabam por ser uma base alimentar para as larvas sendo os *Brachionus sp.* os mais usados para desempenhar esta função. A escolha do alimento para esta espécie de zooplâncton é imprescindível, pois é importante que se consiga cultivá-los em produção intensiva de modo a que estes contenham uma composição nutricional adequada ao bom desenvolvimento das larvas de peixe. Esta dissertação teve por objetivo analisar a resposta da performance dos rotíferos (*Brachionus plicatilis*), após fornecimento de cinco dietas distintas e avaliar essa mesma performance com o fornecimento de enriquecimento do 0-4º dia experimental. A dieta que mais se destacou em relação aos resultados de crescimento diário foi a Chlolev^{Buggypower} (30% *Chlorella sp.* (Buggypower) + 70% Levedura de padreiro) ($p=0,03$). Relativamente às taxas de fertilidade a dieta que se destacou foi a Nanlev^{Nécton} (30% *Nannochloropsis sp.* (Nécton) + 70% Levedura de padreiro) ($p=0,003$). Ao elaborar os quatro ensaios, novas ideias surgiram, como por exemplo, i) prolongar os ensaios, ii) testar apenas uma dieta de crescimento com duas dietas de enriquecimento e iii) oscilar as condições do meio em que os rotíferos estão inseridos, para testar a possibilidade de se poder conservar *stocks* de rotíferos.

Palavras-chaves: *Brachionus plicatilis*; crescimento diário; taxa de fertilidade; enriquecimento; ácidos gordos.

ABSTRACT

The feeding process, in early life phases of marine fish larvae, is a critical point in aquaculture production. Rotifers, being filtering organisms and feed preferences free, are frequently applied in larvae feeds. The *Brachionus* sp. are the most common ones. In order to improve the intensive production of this zooplankton specie, their feeding options are crucial, since they are the source of the adequate nutritional composition in fish larvae feeds. The main objective of this dissertation was to analyze the performance response of the rotifers *Brachionus plicatilis*, when grown on five diets. Each group diet was then evaluated with an enrichment treatment from the 0 to the 4th experimental day. The diet with higher daily growth was Cholev_{Buggypower} (30% *Chlorella* sp. (Buggypower) + 70% bread yeast) ($p=0,03$). Regarding fertility rates the diet with better performance was Nanlev_{Nécton} (30% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 70% bread yeast) ($p=0,003$). In preparing these five assays new ideas emerged for further studies, for example, i) prolong the experimental, ii) apply to only one diet two growth enrichment diets and iii) oscillating the conditions of the environmental in which the poriferous are inserted, to test the possibility of being able to conserve rotifers stocks.

Keywords: *Brachionus plicatilis*; daily growth; fertility rate; enrichment; fat acids.

AGRADECIMENTOS

Para a elaboração deste trabalho contei com o auxílio e colaboração de várias pessoas, umas de forma direta e outras indiretamente, por esse motivo quero prestar-lhes os meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente, quero agradecer aos meus Pais por todo o apoio e alento dado e também pelo esforço que fizeram, para que eu concluísse esta etapa com sucesso. Sabem o quanto importantes são para mim!

Não poderia deixar de agradecer ao meu Namorado, pois foi sem dúvida quem sempre me auxiliou em todos os momentos e por esse e muitos outros motivos, ele sabe o quanto especial é para mim.

Quero agradecer há minha prima Vânia, pela força e apoio que sempre me deu, não podendo deixar de agradecer há minha afilhada Mariana que me deu alento com a sua alegria e energia positiva.

Também quero prestar estes agradecimentos a toda a minha família e amigos, pela força e segurança transmitida no decorrer desta etapa que apesar de boa foi sinuosa.

Agradeço ao Professor Eduardo Rocha, todo o auxílio prestado durante a elaboração desta dissertação e claro, por ter aceitado ser o meu orientador interno.

Agradeço também ao meu orientador externo Dr. Carlos Andrade, por me ter concedido esta oportunidade e pelas orientações prestadas ao longo do meu percurso na instituição.

Quero agradecer a cada um dos elementos que completam a equipa de trabalho do Centro de Maricultura da Calheta, pois cada uma dessas pessoas constitui uma peça fundamental na elaboração experimental e até mesmo escrita. Desta forma decidi citar cada um dos nomes.

Bernardo, um muito obrigada por toda a paciência e informação/aprendizagem de produção de microalgas que me deste, não podendo esquecer das dicas que me foste mencionando no decorrer deste ano. A nossa amizade ficará decerto!

Melissa, um muito obrigada por toda a aprendizagem prática sobre rotíferos e Artémia e acima de tudo pela amizade que ficou.

Maria João, um muito obrigado por toda a informação/aprendizagem que me deu em relação à produção de rotíferos.

James, um obrigado por todo o auxílio na construção do sistema experimental, o apoio, paciência e dedicação que sempre tiveste.

Emanuel o nosso senhor dos reprodutores! Quero agradecer-lhe por toda a aprendizagem, pelas boas horas que passamos ao fim-de-semana de trabalho pelo CMC e nas minhas amostragens. Foi uma peça fundamental, os amigos não se esquecem!

Ricardo quero agradecer-te por todo o apoio prestado ao nível experimental e de redação desta dissertação. A amizade manter-se-á!

Susana, um muito obrigado pela paciência, auxílio e companheirismo, aqui criou-se mais uma amizade.

D. Piedade, um obrigadíssimo por cuidar das minhas experiências e pela amizade.

D. Maria muito obrigada, pelas palavras de alento e pela sua amizade.

Sr. Luís foi sem dúvida o senhor da boa disposição, que me trouxe sorrisos ao rosto, um muito obrigado.

Por fim um agradecimento para Lea foi pena o pouco tempo.

Agradeço ao Professor Pedro Pousão, pelas suas orientações a nível de pesquisa, informações que me foi fornecendo e apesar de não poder ter sido meu segundo Orientador foi nas suas publicações que me inspirei para redigir esta dissertação.

Quero agradecer de igual forma à Professora Nereida Cordeiro e ao Igor Afonso, por todo o apoio ao nível de análises bioquímicas e também à sua equipa de trabalho do laboratório de Bioquímica da Universidade da Madeira, que acabou por me auxiliar em muito.

Quero agradecer a Professora Margarida Cardoso e o Técnico Bruno Ramos, que me auxiliaram no tratamento de dados da minha dissertação e estiveram sempre prontos para ajudarem.

Passo a agradecer à minha amiga Lia Valido, por toda a paciência, tempo dispensado e companheirismo no decorrer deste percurso.

Nesta minha passagem pela Ilha da Madeira, acabei por criar uma nova família e como tal, não posso deixar de agradecer e citar cada uma das pessoas que mais me marcaram nesta caminhada. À D. Encarnação quero dizer-lhe que é como uma segunda mãe para mim, não existiram palavras suficientes para lhe agradecer tudo o que fez, a não ser um, será eterna a nossa ligação. À Lurdes, ela já sabe o quanto importante é para mim, mas aqui reforço que és uma irmã para mim, mais uma vez um obrigadíssimo por tudo. Não posso deixar de agradecer há restante família Ferreira, porque todos vocês participaram de forma ativa nesta minha passagem pela ilha, muito obrigada. Quero agradecer também há família Rodrigues, pela amizade, por tudo que fizeram por mim e pelo apoio dado. Aos meus amigos e vizinhos da Choupana um muito obrigada por tudo de coração e aos restantes amigos madeirenses, não me esquecerei de nenhum de vocês.

Quero deixar os meus agradecimentos, a todos aqueles que não foram citados em particular e que de alguma forma colaboraram na realização de mais uma etapa da minha vida.

Não posso deixar de referir que, todo este percurso académico me fez crescer enquanto pessoa e enquanto profissional, pois foram muitas as etapas apresentadas e superadas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE- Ácidos gordos essenciais
ALA- Ácido linolénico
ARA- Ácido araquidônico
CMC- Centro de Maricultura da Calheta
DHA- Ácido docosahexaenóico
EPA- Ácido eicosapentaenóico
HUFA- Ácidos altamente insaturados
LA- Ácido linoleico
NH₄- Amónia
NO₂⁻ - Nitritos
OA- Ácido oleico
PA- Ácido palmítico
PUFA- Ácidos gordos polinsaturados
O₂- Oxigénio
UE- União Europeia

ÍNDICE GERAL

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
ÍNDICE GERAL	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xiii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. SITUAÇÃO ACTUAL DA AQUACULTURA	14
1.2. ALIMENTAÇÃO DE FASES LARVARES DE PEIXES.....	16
1.3. ROTÍFEROS.....	17
A) BIOLOGIA E ECOLOGIA DE ROTÍFEROS.....	18
B) DIETAS DE CRESCIMENTO VS ENRIQUECIMENTO	20
C) ÁCIDOS GORDOS E A SUA IMPORTÂNCIA	22
2. OBJETIVOS GERAIS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. ÁREA DE ESTUDO	23
A) CULTURA DE FITO E ZOOPLÂNCTON	25
i. CULTURA DE MICROALGAS	26
ii. CULTURA DE ROTIFEROS	28
3.2. DESENHO EXPERIMENTAL.....	29
A) PRÉ-ENSAIOS	29
B) CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	31
C) ENSAIOS.....	32
i) RECOLHA DE AMOSTRAS.....	34
3.3. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS ROTÍFEROS: CÁLCULOS DE CRESCIMENTO E TAXA DE FERTILIDADE.....	36
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4. ENSAIOS.....	37

4.1.	1º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE <i>B. plicatilis</i> , SUBMETIDO A 3 DIETAS DE CRESCIMENTO	37
A)	OBJETIVOS	37
B)	METODOLOGIA.....	37
C)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.2.	2º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE <i>B. plicatilis</i> , SUBMETIDO A 6 DIETAS DISTINTAS, 3 DE CRESCIMENTO E 3 DIETAS DE ENRIQUECIMENTO	41
A)	OBJETIVOS	41
B)	METODOLOGIA.....	41
C)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.3.	3º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO PARA AVALIAR EFEITOS DE MUDANÇA DE DIETA NA PERFORMANCE DE <i>B.plicatilis</i>	46
	1ª ETAPA.....	46
A)	OBJETIVOS	46
B)	METODOLOGIA.....	46
C)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
	2ª ETAPA.....	53
A)	OBJETIVOS	53
B)	METODOLOGIA.....	53
C)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.4.	4º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE <i>B. plicatilis</i> , SUBMETIDO A 2 DIETAS DE CRESCIMENTO E 2 DIETAS DE ENRIQUECIMENTO	57
A)	OBJETIVOS	57
B)	METODOLOGIA.....	57
C)	RESULTADOS	58
5.	CONCLUSÕES.....	62
6.	REFERÊNCIAS.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Pescas e Produção em Aquacultura mundial (FAO 2014).	15
Figura 2- Anatomia interna e externa do <i>Brachionus sp.</i> . Fêmea (esquerda) e macho (direita). Modificado por Koste 1980 (Lavens, 1996).	19
Figura 3- Ciclo reprodutivo do <i>Brachionus plicatilis</i> (Fórumpeixe, 2016).	20
Figura 4- Mesa de amostragens.	30
Figura 5- Manuseamento de rotíferos.	30
Figura 6- Manuseamento na alimentação de rotíferos.	31
Figura 7- Filtração de rotíferos na área experimental.....	35
Figura 8- Massa de rotíferos após lavagem.	35
Figura 9- Recolha de rotíferos com auxílio de uma seringa para efectuar as amostragens de ácidos gordos.	35
Figura 10- Análise de amónia e nitritos.....	36
Figura 11- Segunda etapa do 3º ensaio ao dia 0.	53
Figura 12- Monotorizações diárias dos parâmetros da água.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Condições de cultura das microalgas no CMC (CMC 2013).	26
Tabela 2- Média da densidade de células na fase exponencial (ml de cultura) (CMC 2013).	27
Tabela 3- Tipos de dieta (microalgas vivas, congeladas e liofilizadas) e quantidades celulares desejáveis para formular uma dieta de rotíferos equilibrados (CMC, 2013). 33	
Tabela 4-Densidades celulares das microalgas para que se formule uma dieta adequada (CMC, 2013).	34
Tabela 5- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower e a Chlolev Buggypower.	39
Tabela 6- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade de <i>B. plicatilis</i> com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower e a Chlolev Buggypower.	40
Tabela 7- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower, Chlolev Buggypower e 3 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC, NanRho Buggypower, e a ChloRho Buggypower.	43
Tabela 8- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower, Chlolev Buggypower e 3 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC, NanRho e a ChloRho.	45
Tabela 9- Médias de NH_4 e NO_2^- obtidas após as amostragens do dia 0, 3 e 4.	47
Tabela 10- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, NanIsoRho Experimental e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC e a NanIsoRho Experimental.	48
Tabela 11- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, NanIsoRho Experimental e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC e a NanIsoRho Experimental.	49
Tabela 12- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 6 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton e a NanIsoRho Experimental houve um cruzamento de dietas.	55
Tabela 13- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade de <i>B. plicatilis</i> (%) com duração experimental de 6 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton e a NanIsoRho Experimental houve um cruzamento de dietas.	56

Tabela 14- Médias e desvio padrão do crescimento diário de <i>B. plicatilis</i> (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Iso e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho _{CMC} e a Iso.	59
Tabela 15- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos <i>B. plicatilis</i> (%) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Iso e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho _{CMC} e a Iso.	60

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1- Desenho experimental do 1º ensaio de crescimento. Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.	38
Esquema 2- Desenho experimental do 2º ensaio (crescimento). Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.	42
Esquema 3- Desenho experimental do 2º ensaio (enriquecimento). Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.	42
Esquema 4- Desenho experimental da 1ª etapa do ensaio 3. Administração de duas dietas de crescimento Nanlev Nécton, NanIsoRho _{Experimental} e duas de enriquecimento NanIsoRho _{CMC} e NanIsoRho _{Experimental}	46
Esquema 5- Desenho experimental da 2ª etapa do ensaio 3.	54
Esquema 6- Desenho experimental do 4º ensaio (crescimento). Representação das 2 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.	57
Esquema 7- Desenho experimental do 4º ensaio (enriquecimento). Representação das 2 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.	58

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Canto superior esquerdo (%ARA), canto superior direito (%EPA) canto inferior esquerdo (%DHA) e canto inferior direito (%PUFA). Análise de ácidos gordos essenciais de ambos os tratamentos.	51
---	----

1. INTRODUÇÃO

O termo aquacultura define o cultivo de organismos aquáticos, tais como, peixes, moluscos, crustáceos e plantas (FAO, 2016a). A prática de aquacultura é ancestral e tem vindo a ser exercida por culturas orientais há mais de 2000 anos. A aquacultura associa a ciência e a tecnologia para a produção aquícola de animais e plantas (Lawson,1995).

1.1. SITUAÇÃO ACTUAL DA AQUACULTURA

Segundo os dados mais recentes mencionados pela FAO consegue-se ter a percepção de que a aquacultura é realmente um sector produtivo em expansão. A população mundial está em crescimento e por outro lado, o consumo humano de pescado tem aumentado passando de 10 kg *per capita* na década de 60, para valores superiores a 19 kg *per capita* em 2012 (FAO, 2014). A tendência da procura por alimentação saudável acaba por elevar o consumo de pescado dando origem a uma maior procura do mesmo daí ser extremamente importante produzir-se peixe em piscicultura de forma a contornar a rutura de *stocks* de peixe dos nossos rios e oceanos (FAO, 2015).

Em 2012 a pesca e a aquacultura a nível mundial teve uma produção total de 158 milhões de toneladas de pescado, um aumento de cerca de 10 milhões de toneladas em relação ao ano de 2010 (FAO, 2015). Já em 2013 foi atingida uma produção mundial de 160 milhões de toneladas de pescado (ONUBR, 2014).

Da produção mundial cerca de 91,3 milhões de toneladas são valores de pesca, o que nos mostra que este sector está estagnado há diversos anos consecutivos. A aquacultura, por outro lado atingiu valores de produção que nos mostram ser um sector de crescente em expansão, com um aumento anual de produção de cerca de 6,2% na última década e meia - 50 milhões de toneladas de pescado produzido em 2000, para 70 milhões de toneladas em 2013 (ONUBR, 2014; TecnoAlimentar, 2015), tal como ilustra a figura 1.

Em 2012 a China representou 60 % da produção mundial de produtos de aquacultura passando a destacar-se como o maior produtor mundial (FAO, 2014).

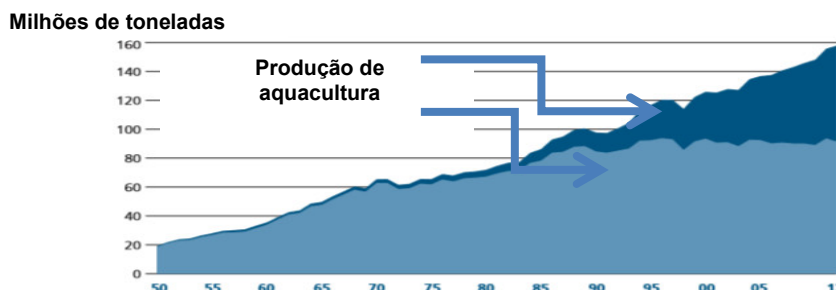


Figura 1- Pescas e Produção em Aquacultura mundial (FAO 2014).

Igualmente em Portugal ocorreu um aumento contínuo da produção o aquícola até 2012, ano em que o país atingiu 10 300 toneladas produzidas, grande parte desta direcionadas ao consumo interno sendo apenas 4 300 toneladas destinadas à exportação. Em 2013 deu-se um pequeno decréscimo da produção passando para 9 995 toneladas devido a uma quebra na produção de pregado (INE, 2014).

A produção de aquacultura com maior importância em Portugal é a de águas salobras e marinhas correspondendo a 92% da totalidade. Os moluscos bivalves representaram 50% do total de produção de aquacultura no país sendo, as espécies produzidas, a ameijoia, mexilhão e ostra (INE, 2014). Dentro deste valor a produção de piscicultura representa cerca de 42% sendo a produção de dourada e pregada a mais significativa (85% do total).

Portugal é um país com um elevado consumo de peixe e como tal acaba por ter que importar grande parte do que consome (TecnoAlimentar, 2015). Segundo dados da FAO (2014), o país consome 60 kg/ano *per capita*, o maior consumo da UE e um dos maiores do mundo.

O crescimento de produção de aquacultura serviu de incentivo para que o sector progredisse ao nível produtivo e tecnológico. A aquacultura pratica-se em vários sistemas de intensificação produtiva (extensivo, semi-intensivo e intensivo) proporcionando uma diversidade tecnológica, como por exemplo, as jangadas, os sistemas automáticos de distribuição de alimentação, os sistemas de recirculação de água associada ao mundo aquícola (Murgas, 2009). Existem também áreas diferenciadas deste sector produtivo, tais como, maternidades, estabelecimentos de engorda, abate transformação, conservação e embalagem de pescado, produtores e fornecedores de rações, entre outros (FAO, 2015).

Esta evolução contribui para a existência de uma maior investigação do sector aquícola para obter melhores resultados de produção. De momento as três grandes áreas de investigação deste sector são constituídas por a) o melhoramento de produção

de espécies já existentes em aquacultura, b) o desenvolvimento de métodos de cultivo para novas espécies que se queiram produzir neste sector e c) o aumento das taxas de sobrevivência quando as espécies produzidas em cativeiro são inseridas no meio natural (repovoamento) (Kaiser, 2011).

No decorrer desta dissertação serão abordados ensaios realizados de modo a avaliar a nutrição mais adequada para uma melhor performance de rotíferos (*Brachionus plicatilis*) de cultura. Os resultados poderão eventualmente otimizar a produção de rotíferos para a cultura de dourada e desta forma contribuir para o melhoramento de produção de espécies já existentes em aquacultura.

1.2. ALIMENTAÇÃO DE FASES LARVARES DE PEIXES

As maternidades de peixe têm como função poder assegurar a produção de alevins para a indústria. A alimentação das fases larvares de peixes, crustáceos e alguns bivalves é considerada um momento crítico em produção aquícola, isto porque as larvas são muito sensíveis e frágeis (Ferreira, 2009). Nesta fase de vida a alimentação deve ser bastante simplificada na cadeia alimentar podendo as larvas ingerir microalgas, rotíferos, Artémia e copépodes (Lubzens, 1995; Shields, 2001).

As larvas necessitam de alimentos com qualidade nutricional adequada e de fácil obtenção. Requerem presas vivas no início da sua alimentação exógena. Este primeiro alimento deve obedecer as seguintes características (Ferreira, 2009; Lubzens, 2003):

- ✓ Possuir um diâmetro adequado (menor 100µm) para que corresponda às dimensões da boca das larvas em cada um dos seus estádios de desenvolvimento;
- ✓ Permanecer na coluna de água e movimentar-se na mesma para estimular o comportamento predatório;
- ✓ Apresentar um cultivo fácil, com ciclo de vida curto produzindo-se em grandes quantidades (altas densidades) e devem ser bastante resistente ao manuseio a que serão sujeitos num estabelecimento de aquacultura;
- ✓ Ter um valor nutritivo adequado ao estágio de desenvolvimento larvar, ou ser fácil de modificar através de técnicas especializadas (bioencapsulação) utilizando-se nessas mesmas técnicas fontes de nutrientes adequadas a uma boa produção larvar.

A cultura de várias espécies de zooplâncton usadas para a alimentação dos estádios larvares de peixes marinhos é feita em grandes volumes e em densidades populacionais elevadas. Esta cultura usa espécies com crescimentos rápidos alcançando elevadas densidades populacionais garantindo assim constantes alimentações diárias das larvas. As duas espécies de zooplâncton mais usadas no cultivo de larvas de peixes marinhos são os rotíferos (*Brachionus sp.*) e *Artemia sp.*. Ambas as espécies têm um crescimento

elevado em condições de cultivo o que é favorável ao nível industrial (Moretti, 1999; Lubzens, 2003).

Quando se iniciaram as primeiras investigações com peixes marinhos o zooplâncton era capturado do seu meio ambiente (Ferreira, 2009). No início da década de 80 apostou-se na cultura de larvas de linguado, onde foram recolhidos ovos de zooplâncton do meio natural para alimentar as larvas (Lopes, 2010). Atualmente recorre-se a este método de captura de zooplâncton no meio natural somente com a finalidade de se encontrar espécies alternativas e com maior proximidade da alimentação natural das larvas a produzir. De acordo com Ferreira (2009), este método é apenas um complemento, pois, as maternidades necessitam de grandes quantidades de zooplâncton e este deve responder de acordo com a qualidade nutricional desejada para o melhor cultivo larvar. Segundo o mesmo autor, a utilização de rotíferos em aquacultura teve início no Japão e foi introduzida na produção de dourada japonesa em meados da década de 1970.

1.3. ROTÍFEROS

Os rotíferos são as primeiras presas vivas a fornecer à maioria das espécies de peixes marinhos em cultura. A produção de rotíferos apresenta vantagens para a aquacultura, pois têm dimensões muito diminutas, o que facilita a alimentação das larvas (apresentam uma dimensão bucal muito reduzida), mas também devem ter uma mobilidade bastante lenta para favorecer a visualização e captura pelas larvas. Apresentam elevadas taxas de reprodução acabando por facilitar o aumento populacional e dessa forma proporcionar sempre alimentação disponível. Possuem elevados valores nutricionais, facilidade de manipulação da composição nutricional e fácil cultivo (Costa, 2008; Lubzens, 1995). Os rotíferos são considerados animais filtradores não seletivos o que facilita a sua alimentação podendo fornecer-se uma elevada diversidade de dietas, entre as quais, as microalgas, as leveduras, as bactérias e os alimentos inertes (Lopes, 2010).

A cultura de várias espécies de zooplâncton usadas para a alimentação dos estádios larvares de peixes marinhos é feita em grandes volumes e densidades populacionais elevadas. Esta cultura usa espécies com crescimentos rápidos alcançando elevadas densidades populacionais garantindo assim, constantes alimentações diárias das larvas. A espécie abordada nos ensaios experimentais realizados nesta dissertação é muito recorrente em aquacultura, pois apresenta elevados polimorfismos (dimensões de 120 a 300 μm) tendo os *B. plicatilis* 250-300 μm . Este polimorfismo facilita a alimentação das larvas até estas atingirem uma dimensão bucal que possibilite a ingestão de alimentos com dimensões superiores a 300 μm (Ferreira, 2009).

A) BIOLOGIA E ECOLOGIA DE ROTÍFEROS

Os rotíferos são um pequeno grupo do Filo *Rotífera* estes organismos aquáticos são pseudocelomados, invertebrados e não segmentados integrando-se assim no grupo dos metazoários. Estes organismos aquáticos podem, viver em ambientes de água doce, marinhos e águas salobras (Dhert, 2001) sendo considerada uma espécie eurihalina podendo crescer em meio de 2 a 96 de salinidade (Lowe, 2005).

Taxonomia de *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786) (WoRMS, 2015):

- ✓ Reino: *Animalia*
- ✓ Filo: *Rotífera*
- ✓ Classe: Eurotatoria
- ✓ Sub-classe: *Monogononta*
- ✓ Super-ordem: *Pseudotrocha*
- ✓ Ordem: *Ploima*
- ✓ Família: *Brachionidae*
- ✓ Gênero: *Brachionus*
- ✓ Espécie: *Brachionus plicatilis*

Relativamente à morfologia dos rotíferos, estes têm uma coroa anterior apical ciliada que é usada na deslocação e na alimentação. Os cílios existentes na coroa apical possuem a capacidade de descrever movimentos metacoronais. São estas características que possibilitam a distinção destes metazoários de outros existentes no meio aquático (Lubzens, 2003).

Os rotíferos possuem três regiões distintas: a cabeça (esta suporta a coroa ciliada), o corpo e o pé (Lavens, 1996) - figura 2. Estes organismos possuem glândulas secretoras que produzem um muco que facilita-lhes a ligação provisória ao substrato. O corpo destes metazoários é envolvido pela lórica (cutícula extracelular) sendo a forma e o comprimento desta cutícula que permite a distinção entre espécies de rotíferos. Estes organismos aquáticos alimentam-se, através da captura feita pelos cílios da coroa e pelo mastax (Yúfera, 2001).

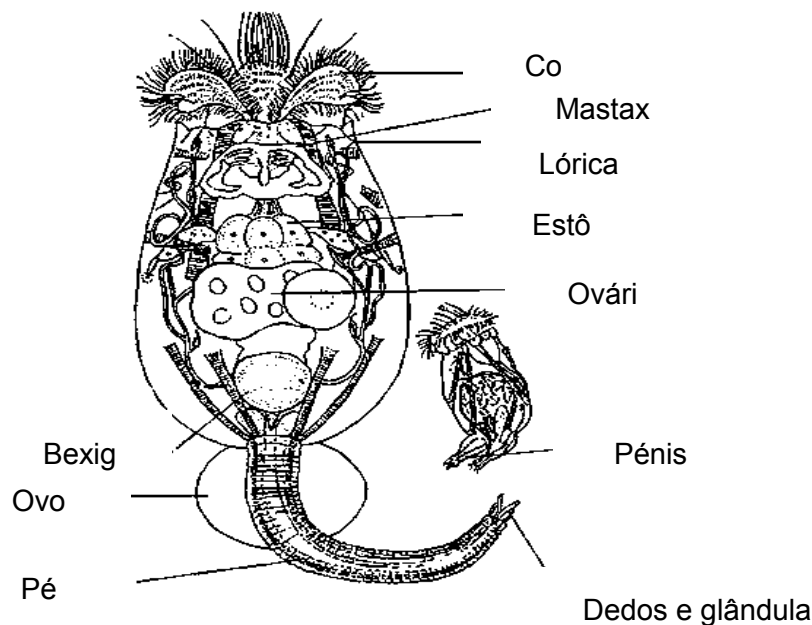


Figura 2- Anatomia interna e externa do *Brachionus sp.*. Fêmea (esquerda) e macho (direita). Modificado por Koste 1980 (Lavens, 1996).

Segundo Dhert (2001), esta espécie exibe um ciclo de vida curto com durabilidade de 3,4 a 4,4 dias, a uma temperatura de 25° C embora em condições ótimas possam atingir em média 6 a 8 dias (Ferreira, 2009). Após eclosão atingem estado adulto aos 0,5 a 1,5 dias podendo as fêmeas até ao seu fim de vida reproduzir até 10 gerações (Dhert, 2001).

Brachionus plicatilis é uma espécie de rotíferos com uma elevada capacidade reprodutiva promovendo a sua produção em massa (Paula, 1994).

Quanto ao ciclo de vida do *Brachionus plicatilis* diz-se que esta espécie pode reproduzir-se por via assexuada (via partengénica) ou via sexuada (Dhert, 2001; FAO, 2016b), tal como ilustra a figura 3.

A reprodução assexuada é a mais comum no cultivo intensivo das maternidades (Ferreira, 2009), isto porque por esta via, as fêmeas denominadas como amícticas ou partenogénicas formam ovos diplóides não fecundados, dando esses ovos origem a novas fêmeas para dar continuidade aos novos ciclos reprodutivos.

A reprodução sexuada pode ter início com a interrupção da via partenogénica. Esta interrupção pode dar-se devido a vários factores de origem exógena, tais como, a temperatura, a densidade populacional, a alimentação, ou através de factores endógenos, como por exemplo, a idade (Lubzens, 2003).

Na reprodução por via sexuada, as fêmeas denominam-se por mícticas os ovos destas sofrem processos de meiose dando origem a ovos haplóides. Estes ovos não tendo sido fecundados originam machos e caso haja a fecundação dão origem a ovos de

ressistência (Lubzens, 2003). Os ovos em diapausa são constituídos por córion espesso e ornamentado. Este tipo de eclosão dá sempre origem a uma fêmea amíctica iniciando-se assim um novo ciclo reprodutivo assexuado (Pou, 2001). A densidade populacional, a temperatura, a salinidade, a disponibilidade e qualidade do alimento ditam o número de ovos por fêmea e o número de ovos de resistência (Herzig, 2005).

As microalgas impulsionam o número de fêmeas amícticas e os número de ovos de resistência. Por exemplo, rotíferos alimentados com *Chlorella sp.*, mostram ter maior número de fêmeas amícticas (reprodução assexuada). Já rotíferos alimentados com leveduras mostram ser propícios a ter ovos de resistência e apresentam maiores dimensões (Pourriot, 1989).

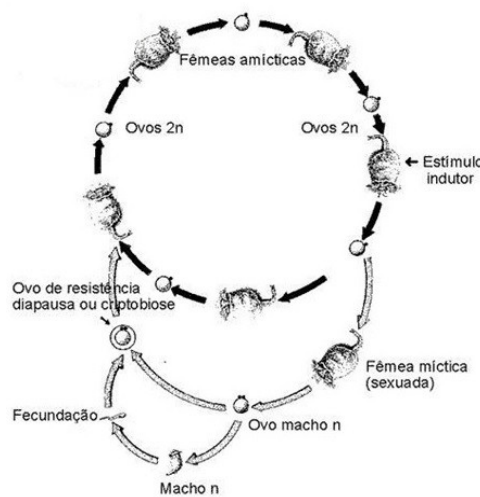


Figura 3- Ciclo reprodutivo do *Brachionus plicatilis* (Fórumpeixe, 2016).

Em produção deve-se favorecer o ciclo de reprodução assexuada nos rotíferos, pois estes trás vantagens produtivas e maximiza todo o cultivo de uma maternidade de peixe (Ferreira, 2009).

B) DIETAS DE CRESCIMENTO VS ENRIQUECIMENTO

Os rotíferos têm uma elevada importância no desenvolvimento das larvas, pois mostram ter uma capacidade de “cápsula alimentar viva” retendo os nutrientes, as vitaminas e os antibióticos que serão posteriormente absorvidos pelas larvas. O valor nutricional destes organismos está dependente do seu peso seco e composição bioquímica (Lubzens, 1995).

Estudos sobre a alimentação de rotíferos mencionam que determinados tipos de dietas com certas características obtém melhores resultados ao nível de taxas de

crescimento e fertilidade (Ferreira, 2009; Hansen, 1997). Apesar de se ter referido que a espécie *Brachionus plicatilis* não é seletiva na sua alimentação (eurifágicos) verificou-se que esta tem preferência por dietas de qualidade e dimensionamento de 15 µm (Hansen, 1997; Azemar, 2006). A taxa de filtração desta espécie de rotífero está diretamente relacionada com as características e estado de conservação da dieta (Azemar, 2006).

A alimentação de rotíferos é feita com os seguintes produtos (Dhert, 2001; Lubzens, 2003):

- ✓ Microalgas vivas (*Nannochloropsis sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis galbana*);
- ✓ Levedura de padeiro;
- ✓ Emulsões;
- ✓ Microalgas liofilizadas;
- ✓ Pastas concentradas de microalgas (microalgas congeladas).

O fornecimento de dietas apenas com levedura de padeiro não é o mais apropriado, pois não confere aos rotíferos os ácidos gordos necessários e por sua vez as larvas a quem são fornecidos não se desenvolvem adequadamente (Allan, 2013).

Para que os rotíferos tenham uma incorporação de nutrientes adequada é necessário fornecer-lhes ácidos gordos polinsaturados, de cadeia longa n-3 (HUFA), através do enriquecimento, processo designado por bioencapsulação (Lubzens, 2003). O défice dos ácidos gordos da cadeia n-3 (EPA e DHA) pode causar malformações na coluna das larvas das espécies em cultura e taxas de mortalidade muito elevadas (Zambonino, 2010), o que trás prejuízos para as maternidades. Dessa forma este sector de produção teve de arranjar estratégias para controlar esses prejuízos. Devem-se aperfeiçoar as dietas fornecidas aos rotíferos para providenciar às larvas de organismos cultivados a composição nutricional mais adequada e ao menor custo. Para isso faz-se o enriquecimento dos rotíferos previamente ao seu uso como alimento, com uma dieta rica em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), durante um período de tempo inferior a 24 horas (Vijayagopal, 2012). A qualidade do produto de alimentação do rotífero e a duração do enriquecimento estão relacionadas com a qualidade química final do rotífero (Ferreira, 2009).

Os enriquecimentos são muito importantes, pois permitem manipular os lípidos para que se consiga fornecer às larvas os ácidos gordos essenciais (AGE) para obter o seu bom crescimento, desenvolvimento e boas taxas de sobrevivência larvar (Planas, 1999; Sargent, 1999).

O fitoplâncton tem um papel extremamente importante no bom desenvolvimento larvar, pois além de ser fornecido para proporcionar o equilíbrio dos valores nutricionais da dieta das larvas, também pode ser usado como “técnica de águas verdes” auxiliando assim no aumento das taxas de crescimento das larvas, no seu bom desenvolvimento e

até na sua sobrevivência (Planas, 1999; Lubzens, 2003). Posto isto deve-se ter em conta a escolha das microalgas, pois, cada uma delas contém diferentes ácidos gordos essenciais.

A *Isochrysis galbana* (cor castanha) tem, valores elevados de DHA (ácido docosahexaenóico- 22:6n-3). Já as microalgas verdes, como a *Nannochloropsis oculata* são ricas em EPA (ácido eicosapentaenóico- 20:5n-3) (Lucas, 2012). A mistura destas duas algas acaba por conferir aos rotíferos uma composição química mais aqueda para a alimentação das larvas de peixes marinhos.

Para que as taxas de crescimento de *B. plicatilis* tenham um aumento progressivo é necessário que as condições abióticas, quantidade e qualidade do alimento e intervalo de fornecimento de alimento sejam ajustados (Ferreira, 2009).

Os alimentos vão evoluindo com o crescimento das larvas até atingirem o alimento inerte (Moretti, 1999).

C) ÁCIDOS GORDOS E A SUA IMPORTÂNCIA

Os lípidos têm um papel de elevada importância, pois são fonte de energia e ácidos gordos essenciais transportando para o organismo outros compostos lipossolúveis (vitaminas e carotenoides) (Rainuzzo, 1997; Sargent, 2002).

Os ácidos gordos são utilizados pelos peixes marinhos (carnívoros) para gerar energia metabólica, via β -oxidação mitocondrial. Quando a síntese de ácidos gordos não é feita em quantidades essenciais para a realização de vários processos biológicos obtêm-se através da alimentação, a estes dá-se o nome de ácidos gordos essenciais (AGE) (Sargent, 2002).

Para que peixes tenham um bom crescimento, desenvolvimento adequado e uma boa taxa de sobrevivência a sua dieta têm de conter três ácidos gordos polinsaturados (PUFA) de cadeia longa (DHA, EPA e ARA) e denominados de ácidos gordos altamente insaturados (HUFA) (Rainuzzo, 1997; Izquierdo, 2005).

Os peixes de água salgada têm um metabolismo enzimático diferente dos de água doce, pois as enzimas dessaturases e elongases ($\Delta 5$ e $\Delta 6$) têm uma atividade tão reduzida que conferem dificuldade ao produzir DHA, EPA, ARA a partir dos seus precursores, os ácidos linolénico (ALA, 18:3n-3) e o linoleico (LA, 18:2n-6) (Tocher, 2003). Posto isto, as dietas fornecidas aos peixes marinhos devem conter na sua composição um suplemento em AGE (Koven, 1992) tendo as suas larvas exigências nutricionais em HUFA (Izquierdo, 2005).

Os PUFA têm um papel extremamente importante nas funções vitais das larvas tanto ao nível celular como fisiológico. Estes presam pelo fundamento de boas estruturas larvares e pelo bom funcionamento das membranas celulares (Tocher, 2003).

Os ácidos gordos DHA, EPA, oleico (OA, 18:1n-9) e palmítico (PA, 16:0) estão presentes nas membranas celulares das larvas, já o ARA não apresenta grandes quantidades (Sargent, 2002).

O DHA é muito estudado, pois, existe em grandes quantidades nos tecidos do cérebro e no olho das larvas. O EPA e ARA participam em diversas funções fisiológicas da larva sendo uma delas a osmorregulação, contudo estão presentes em menor quantidade no organismo da larva do que o DHA (Tocher, 2003).

Na atualidade continuam a fazer-se variados estudos para estabelecer as proporções adequadas de cada um dos AGE na dieta das larvas, para obter-se melhores resultados de crescimento, taxas de sobrevivência e desenvolvimento anatómico adequado (Bessonart, 1999; Lund, 2008).

2. OBJETIVOS GERAIS

A presente dissertação tem por objetivo avaliar diferentes dietas e formas de produção com enriquecimento de *Brachionus plicatilis*, para otimizar a sua qualidade nutricional, para uma consequente melhoria da nutrição larvar das espécies de cultura. Potencia-se assim, maior taxa de crescimento, melhor resistência a agentes patogénicos e bem-estar geral da espécie a produzir.

Para atingir os objetivos desta dissertação foram usadas duas abordagens distintas:

- ✓ Numa primeira fase verificar a performance dos rotíferos em ensaios de crescimento (taxas de crescimento e fertilidade);
- ✓ Na segunda fase verificar a eficácia da bioencapsulação de lípidos pelos rotíferos.

Tendo em conta estas duas fases experimentais foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- ✓ Comparar as performances dos rotíferos com as diferentes dietas experimentais;
- ✓ Comparar as performances dos rotíferos produzidos pelo método convencional (com enriquecimento do 3 para o 4º dia de cultura) com a produção/enriquecimento contínuo (0 ao 4º dia);
- ✓ Analisar o perfil de ácidos gordos entre dia 0 e dia de cultura (antes do enriquecimento) e dia 4 (após enriquecimento).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDO

Toda esta dissertação decorreu no Centro de Maricultura da Calheta (CMC), um centro de investigação e a única maternidade com significativa venda de alevins de peixes marinhos no país. É uma infraestrutura do Governo Regional da Madeira

pertencente à Secretaria da Agricultura, Direção Regional de Pescas e situa-se no município da Calheta (Região Autónoma da Madeira).

Nesta maternidade existem vários sectores de produção aquícola:

- ✓ A área de reprodutores;
- ✓ A área de incubação de ovos de peixe de cultura larvar (grandes tanques de cultura em mesocosmos);
- ✓ Laboratório e sala de cultura de microalgas;
- ✓ Área de produção de rotíferos e Artémia;
- ✓ Zona de desmame;
- ✓ Edifício que aloja grandes espécies como os meros (*Epinephelus marginatus*) e charuteiros (*Seriola dumerili*).

Na área dos reprodutores o CMC tem tanques com encharéu (*Pseudocaranx dentex*), douradas (*Sparus aurata*), pargo comum (*Pagrus pagrus*), pargo capelo (*Dentex gibbosus*) e sargos (*Diplodus sargus*). Estes peixes são os reprodutores das produções de juvenis que o centro efetua. São mantidos às condições aquáticas desejadas para cada espécie de forma a reunirem boas condições reprodutivas.

Neste sector fazem-se monitorizações diárias de temperatura, oxigénio e controlo do estado de cada um dos 8 tanques existentes de modo a ter sempre todos os peixes em excelentes condições físicas. Todos os tanques são limpos (sifonados) em dias alternados, para que as condições físico-químicas da água sejam mantidas.

As douradas são a espécie produzida pelo CMC com maior abundância. Os espécimes de *Sparus aurata* são acondicionados de forma a poderem iniciar o seu ciclo reprodutivo em Dezembro - Janeiro. As primeiras posturas não possuem boa viabilidade para serem incubadas, contudo desde o primeiro dia de posturas os técnicos do sector contabilizam o número de ovos de cada tanque e calculam a sua viabilidade podendo perceber a evolução do ciclo reprodutivo de cada um dos tanques de reprodutores. As contagens de ovos são efetuadas diariamente e logo pelas primeiras horas laborais, isto porque se obtiverem 350-400,000 ovos com no mínimo 55% de viabilidade poder-se-á leva-los para os tanques mesocosmos (40.000 litros) onde são incubados e se realiza a cultura larvar.

Após contagem de ovos e obtenção dos valores de taxas de viabilidade levam-se os baldes com os volumes de ovos necessários para o sector de mesocosmos. Já nos tanques mesocosmos os ovos são desinfetados com formaldeído a 37% e é colocado um sistema um arejamento dentro desse mesmo balde para que haja uma recirculação de água e oxigenação dos ovos durante 5 minutos. Este procedimento é feito para que o formol desinfete os ovos de possível existência de parasitas e outros agentes

patogénicos. Em cada litro de água são adicionados 2 ml de formol, isto para os ovos de dourada e sargo.

Antes de se distribuírem os ovos pelo tanque colocam-se uns aquários de 3000 ml dentro de cada um dos tanques mesocosmos, com 100 ovos cada um para poder-se avaliar a taxa de eclosão por tanque. Após os dois processos acima mencionados passa-se à distribuição dos ovos pelo tanque introduz-se o balde de 40 litros na coluna de água do tanque meso e inclina-se o balde até começar a verter lentamente o volume para a coluna de água. Para que a distribuição seja homogénea segue-se o sentido circular do tanque de meso para que todo ele tenha distribuição homogénea de ovos.

Neste sector as larvas são mantidas durante aproximadamente 2 meses e nesse período vão crescendo sendo alimentadas de acordo com o seu estado de desenvolvimento. Aos 3-4 dias após eclosão das larvas iniciam a sua alimentação é feita com rotíferos enriquecidos (isto porque os 2-3 primeiros dias de vida as larvas alimentam-se do seu saco vitelino) e mantem essa mesma dieta até as larvas atingirem os 5 mm, pois nesta fase de desenvolvimento larvar já conseguem ingerir *Artemia sp.*. A alimentação com *Artemia sp.* é feita até as larvas atingirem os 8 mm de comprimento, nesta fase já iniciam a alimentação com ração inerte de diâmetro apropriado ao tamanho da boca da larva.

Como os tanques são mesocosmos, as larvas ao serem alimentadas com rotíferos também é adicionado ao tanque microalgas vivas para que no próprio tanque cresçam fito e zooplâncton e dessa forma haja sempre alimento até que as larvas atinjam 5 mm. Ao alcançarem este comprimento passam a ter uma dieta de uma outra espécie de zooplâncton e nesse momento cessam-se as adições de microalgas aos tanques de meso. Nestes tanques fazem-se as monotorizações diárias, medições de larvas quando necessário e limpezas de superfície e fundos também estas diárias.

Na área de *weaning* (desmame) as larvas chegam a este sector com 8 mm e crescem durante aproximadamente 2 meses saindo para as jangadas com 5-10 g. Também neste sector efetuam-se monotorizações e limpezas de tanques diárias.

Em paralelo com a produção larvar tem-se o sector de produção de alimento vivo e o laboratório.

Como esta dissertação incidiu sobre a produção de alimentos vivos este tema será pormenorizado nos tópicos abaixo.

A) CULTURA DE FITO E ZOOPLÂNCTON

As microalgas são utilizadas para produzir grandes quantidades de zooplâncton (exemplo: os rotíferos, copépodes e *Artémia*). Estes microrganismos de origem animal acabam por auxiliar na alimentação de larvas e numa fase inicial de juvenis peixes e

crustáceos (Ferreira, 2014). As microalgas além de serem utilizadas para a produção de zooplâncton, também são usadas para produzirem larvas de peixes marinhos, segundo a “técnica da água verde” que consiste na adição e manutenção de aproximadamente 150 000 células/ml de microalgas nos tanques de produção larvar (Ferreira, 2009). Crêe-se que estes micoorganismos de origem vegetal têm um papel bastante relevante na estabilidade da qualidade da água, nutrição larvar e controlo microbiano (Lavens, 1996).

i. CULTURA DE MICROALGAS

No CMC as microalgas são produzidas pelo método de volumes limitados (“batch”), este consiste num volume inicial que nunca se altera até ao fim da cultura. Neste centro as microalgas são produzidas em duas fases (a pré-cultura e a cultura principal). Na pré-cultura tem-se por objetivo promover as condições abióticas do meio de modo a manter as culturas na fase exponencial de crescimento. Já na cultura principal, o objetivo é produzir grandes volumes de culturas com densidades elevadas de células num prazo de 5 a 7 dias (CMC, 2013).

As microalgas produzidas no CMC são as seguintes, a *Nannochloropsis oculata*, a *Isochrysis galbana* e a *Rhodomonas marina* sendo estas as microalgas utilizadas em algumas das experiências feitas nesta dissertação. Este fitoplâncton é mantido em cultura em condições ambientais adequadas (tabela 1).

Tabela 1- Condições de cultura das microalgas no CMC (CMC 2013).

Ambiente físico		Ambiente Químico		
Luz (lux)	Temperatura (°C)	Dióxido de carbono (mg/l)	pH	Salinidade
2000	18-22	Adicionado 2 vezes ao dia para controle de pH	7,5-9	25

As culturas utilizadas nas experiências eram provenientes da fase de cultura principal nas diferentes espécies de microalgas. As densidades médias de células de microalgas em cultura prévia às experiências são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Média da densidade de células na fase exponencial (ml de cultura) (CMC 2013).

Nº de células por ml de cultura		
<i>Nannochloropsis sp.</i>	<i>Isochrysis galbana</i>	<i>Rhodomonas marina</i>
25-30x10 ⁶ células/ml	25-30x10 ⁶ células/ml	3-4x10 ⁶ células/ml

Nannochloropsis oculata é uma microalga unicelular não flagelada possui um diâmetro de 2-4 µm, as suas células têm um formato circular ou ligeiramente oval e têm coloração verde. Esta microalga é de interesse para a aquacultura por ter células de pequenas dimensões, com um crescimento bastante rápido e por ser de fácil produção. É uma das espécies mais comuns na produção de rotíferos, para o cultivo de larvas de peixe em “Técnica de águas verdes” e, além disso, tem vantagens ao nível dos ácidos gordos essenciais, pois possuem elevado valor em EPA (Rodolfi, 2009).

Em relação à *Isochrysis galbana* trata-se de uma microalga unicelular flagelada (Richmond, 2004), esta apresenta uma cor castanha-dourada (Sánchez, 2000) e tem um diâmetro de 4-6 µm (Poisson, 2001). *I. galbana* é usada em aquacultura pois possui várias características favoráveis à alimentação de rotíferos e larvas de peixes. Em relação às suas características nutricionais é de salientar que esta microalga é rica em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), dentro destes o ácido docosahexanóico (DHA) existe em percentagens de 5,3-14,4% podendo mesmo ter uma maior abundância na fase de crescimento exponencial da microalga (Richmond, 2004).

Rhodomonas marina é uma microalga unicelular flagelada de coloração vermelha e o seu diâmetro varia entre 9,2-9,9 µm (Cruz, 2006). Esta microalga tem interesse para a alimentação das primeiras fases larvares dos peixes por atingir uma percentagem de PUFA de 30,99% numa fase bastante precoce do estágio estacionário (Fernández-Reiriz, 1989) e por proporcionar um crescimento e uma composição vantajosa para a produção e enriquecimento de *Artemia sp.* (Seixas, 2009).

Para as microalgas serem fornecidas como alimentação aos rotíferos é necessário fazerem-se contagens diárias de forma a poder-se verificar em que fase de crescimento estão.

ii. CULTURA DE ROTIFEROS

No CMC são produzidas duas estirpes de rotíferos, os *Brachionus rotundiformis* (estirpe S) e os *Brachionus plicatilis* (estirpe L). Ambas as estirpes de rotíferos são produzidas pelo método descontínuo numa fase inicial e com volumes superiores passam a usar método semi-contínuo (CMC, 2013). As culturas de rotíferos são realizadas de forma sucessiva em tanques de maior volume para atingir-se o número de rotíferos necessários para a alimentação de larvas de peixes da área de produção ou investigação.

O método descontínuo consiste em iniciar-se o cultivo de rotíferos com um pequeno volume, ao qual será adicionado um volume de microalgas (alimento) de dois em dois dias para promover o crescimento da população de rotíferos. A alimentação é fornecida em função do número de rotíferos existentes no balão. Quando é atingida a concentração máxima de rotíferos (500 rotíferos/ml), estes são replicados para um novo balão (manutenção de *stocks*) ou passam para os tanques de produção (CMC, 2013).

Nos tanques de produção de 200 l os rotíferos são mantidos em crescimento durante um prazo máximo de cinco dias. Neste período as populações de cada tanque de crescimento poderão atingir os 500 rotíferos/ml. Ao atingirem estas densidades populacionais o volume é dividido em 2 novos tanques para preservar as qualidades físico-químicas da água e assim impulsionar o crescimento da população.

Quando os 4 tanques de crescimento atingem as densidades populacionais de 500 rotíferos/ml, estes são transferidos para um novo tanque e assim inicia-se um tanque de produção de 1800 litros. A gestão da população de rotíferos nestes últimos tanques é realizada de forma similar à dos tanques de 200 litros.

Nos tanques de produção as condições ótimas são as seguintes:

- ✓ Densidade populacional: 800-1000 rotíferos/ml;
- ✓ Temperatura ótima: 25-26°C;
- ✓ Oxigénio desejado: 8-13 mg/l;
- ✓ pH desejado: 7,5-8,5;
- ✓ Volume usado: 1000 litros.

Quando as larvas de peixes em cultura nos tanques de mesocosmos atingem o 3º ou 4º dia de produção um tanque de rotíferos no máximo de densidade populacional é recolhido, filtrado e enriquecido para que se possam alimentar as larvas.

Para poder-se alimentar os rotíferos e para enriquecê-los é necessário efetuar-se processos de contagens em cada um dos tanques.

Bioencapsulação:

O modo de se efetuar o enriquecimento de rotíferos é através da bioencapsulação. Neste procedimento faz-se a recolha (filtração) de rotíferos de um tanque de produção ou enriquecimento direto no tanque. Filtra-se o número de rotíferos necessários lavam-se e colocam-se num tanque de menor volume, onde serão enriquecidos com microalgas vivas, emulsões feitas em laboratório ou com produtos comerciais. Já no segundo procedimento, o enriquecimento é feito diretamente no tanque de produção tendo-se em conta a concentração de indivíduos no tanque exigirá maiores concentrações de enriquecimentos. Os enriquecimentos são feitos em tempos variados, pois cada produto usado exige diferentes tempos de ação, como por exemplo, no caso das microalgas devem ter um período de atuação de 12-18h, enquanto os produtos comerciais no mínimo terão uma duração de 4-6h (Ferreira, 2009).

3.2. DESENHO EXPERIMENTAL

No decorrer desta dissertação o trabalho experimental passou por diversas fases:

- ✓ Pré-ensaios e testes de treino para afinar as técnicas de produção na área experimental nomeadamente para:
 - Avaliar os melhores recipientes para produção de rotíferos, bem como a temperatura, pH, oxigenação e luminosidade mais adequados;
 - Afinar técnicas de amostragem de rotíferos para contagem e determinação da taxa de fertilidade, assim como para as análises bioquímicas;
- ✓ Ensaios de alimentação:
 - Em diversas experiências avaliou-se a performance dos rotíferos com diversas dietas de produção e de enriquecimento.

A) PRÉ-ENSAIOS

Antes de se dar início às cinco experiências fez-se pré-ensaios experimentais. Estes foram realizados para que se pudessem afinar as técnicas na área experimental para conseguir-se produzir rotíferos, tal como, na área de produção no CMC, mas aplicado ao local e condições experimentais.

Com estes pré-ensaios criou-se um protocolo específico para a área experimental, para que fosse muito semelhante à produção intensiva em larga escala feita na área de produção de rotíferos. Neste protocolo foram afinadas técnicas de amostragem, homogeneização, manuseamento e alimentação de rotíferos.

As amostragens foram aperfeiçoadas pelas técnicas dos protocolos. Os materiais usados eram mantidos numa mesa de amostragem (figura 4) e constavam de crivo de malha 55 µm, eppendorfs identificados, seringa de 2 ml, uma colher de café, um gobelé

com lixívia a 13% e água doce (desinfecção) e outro com água doce (para passar a seringa e colher depois de desinfetados), água destilada, água com uma salinidade de 25 e álcool 95%, para desinfetar a mesa experimental e as mãos.



Figura 4- Mesa de amostragens.

A desinfecção entre tratamentos era feita com a passagem do material usado por um balde com lixívia + água doce e posteriormente passava-se apenas por água doce.



Figura 5- Manuseamento de rotíferos.

A figura 5 ilustra uma nova técnica de manuseamento do protocolo experimental. Nesta técnica tentou-se diminuir o impacto da queda dos rotíferos na coluna de água. Usou-se um novo instrumento de trabalho (funil + mangueira) que acabava por atravessar mais de meia coluna de água do tanque. Os rotíferos ao passarem por este equipamento não sofriam uma queda tão acentuada na coluna de água diminuindo assim a mortalidade de indivíduos.

Também a alimentação com microalgas ou outras dietas era feita com o sistema mencionado acima para que rapidamente se espalhasse na coluna de água, mas sem grande impacto no meio em que os rotíferos estavam inseridos, tal como, ilustra a figura 6.

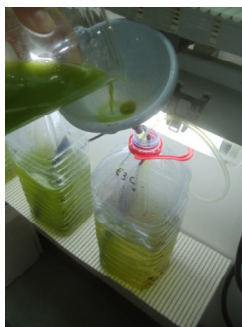


Figura 6- Manuseamento na alimentação de rotíferos.

Nestes pré-ensaios acabou-se por ajustar todo o protocolo de forma a conseguir-se produzir rotíferos em volume de 8 litros. Após esta fase de aprendizagem e de preparação prosseguiu-se para os quatro ensaios.

Segundo o protocolo elaborado para a área experimental os quatro ensaios seguiram as condições experimentais citadas abaixo.

B) CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

As condições experimentais ao longo dos ensaios foram as seguintes:

- ✓ A espécie de rotífero foi *Brachionus plicatilis*.
- ✓ As espécies de microalgas usadas foram: *Nannochloropsis oculata* (viva), *Nannochloropsis sp.* (congelada), *Isochrysis galbana* (viva) e *Rhodomonas marina* (viva), *Rhodomonas salina* (congelada) e *Chlorella sp.* (congelada).
- ✓ O grupo controlo (C) dos ensaios 1, 2, 3, 4 repetia o protocolo de produção de rotíferos em larga escala do CMC, ou seja, produzir rotíferos desde o dia 0-3º com uma dieta Nanlev_{Nécton} = 30% *Nannochloropsis sp.* (congelada da empresa Nécton) + 70% de levadura de padeiro (Mauri) sendo esta uma dieta de crescimento. Do 3-4º dia poderia ser feito o enriquecimento dos rotíferos com uma mistura das microalgas dieta NanIsoRho_{CMC} = 50% *Nannochloropsis sp.* (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* + 10% *Rhodomonas marina*.

Em relação à alimentação poderemos administrar 5 a 10% de fitoplâncton vivo (Ferreira, 2009) desde que as densidades sejam para a alga verde (*Nannochloropsis oculata*) 25 a 50x10⁶ células/ml, para a microalga castanha (*Isochrysis galbana*) de 10 a 25x10⁶ células/ml e para a microalga vermelha (*Rhodomonas marina*) de 2 a 5x10⁶ células/ml (CMC, 2013).

Todos os 4 ensaios foram mantidos sob as mesmas condições do meio aquático sendo essas as seguintes:

- ✓ Temperatura- 24°C;

- ✓ Oxigenação- 5 a 10 mg/l;
- ✓ pH- 7,5 a 8,5;
- ✓ Amónia- <0,5 mg/l (Queiroz, 2007);
- ✓ Nitritos- <0,05 mg/l (Queiroz, 2007);
- ✓ Salinidade- 25 (Cabrera, 2005);
- ✓ Fotoperíodo - 8 horas dia e 16 horas noite;
- ✓ Densidade populacional inicial – 60 a 100 rotíferos/ml;
- ✓ Densidade populacional final - 400 rotíferos/ml;
- ✓ Volume inicial - 5 litros;
- ✓ Volume final - 8 litros.

C) ENSAIOS

Em todos os quatro ensaios foi necessário calcular-se o volume a retirar de um tanque de produção intensiva (1800 litros) com o número de rotíferos suficiente para todos os tanques de cada um dos ensaios.

Os rotíferos recolhidos na área de produção eram levados cuidadosamente até à área experimental onde eram mantidos em arejamento. O balde era deixado em repouso durante 20-30 minutos. Posteriormente, os rotíferos eram recolhidos num volume correspondente ao número de indivíduos a adicionar a cada tanque experimental (5 litros de volume) para se obter uma densidade de $1,5 \times 10^6$ rotíferos/ml. De seguida eram inseridos em cada um dos tanques, com um controlo apertado de manuseamento. Aguardava-se 20 a 30 minutos para que os rotíferos adicionados a cada um dos tanques distribuam-se homogeneamente pela coluna de água.

Depois eram recolhidos 100 ml de amostra de cada tanque o mais homogénea possível para se efetuar as primeiras contagens com o objetivo de se obter a densidade populacional de cada tanque e consoante esta administrar a alimentação de acordo com o número de indivíduos existente.

Antes dos rotíferos recolhidos serem transferidos para os seus novos tanques os parâmetros ambientais já tinham sido monitorizados para prevenir mudanças bruscas da qualidade de água. Cerca de 30 minutos após a alimentação monitorizava-se mais uma vez cada um dos tanques para verificar os valores de temperatura, oxigénio e pH.

Nos dias de ensaio seguintes as tarefas diárias eram:

1. Acender as luzes às 08h35;
2. Purgas (descargas de fundo) a cada tanque logo às 08h40;
3. Monitorização de temperaturas e oxigénios;
4. Recolha de 100 ml de amostra de cada um dos tanques para monitorizar o pH e efetuar as contagens diárias de rotíferos;

5. Após obtenção dos dados das contagens preparava-se a alimentação para cada um dos tanques;
6. Adição de uma única alimentação a cada um dos tanques (às 11 horas);
7. Adição de um volume calculado de água a 25 a cada um dos tanques;
Esta prática auxiliaria no controlo da densidade populacional de cada um dos tanques experimentais.
8. Purgas ao fim do dia laboral (14h50).

Nota: Em todas as experiências era adicionado o volume de dieta e de seguida perfazia-se o restante volume para que a concentração de rotíferos se mantivesse entre os 250-350 rotíferos/ml e para que todos os tanques ficassem com o mesmo volume.

Formulação das dietas experimentais

Os rotíferos podem ser alimentados com diferentes tipos de dieta (microalgas congeladas, liofilizadas e vivas) fornecendo-se também levedura de padeiro para otimizar os custos de produção (Ferreira, 2009). Existem dietas direcionadas ao crescimento de rotíferos e outras que são facultadas apenas no enriquecimento destes seres vivos.

A alimentação de rotíferos foi realizada em função do número total de rotíferos existentes em cada um dos tanques ($1,5 \times 10^6$). Para a dieta de crescimento deve-se utilizar 30% de microalga e 70% de levedura de padeiro (CMC, 2013).

Na produção intensiva de rotíferos as dietas usadas constam das tabelas 3 e 4.

Tabela 3- Tipos de dieta (microalgas vivas, congeladas e liofilizadas) e quantidades celulares desejáveis para formular uma dieta de rotíferos equilibrados (CMC, 2013).

Dias de produção	Microalgas congeladas (g/milhão de rotíferos)	Microalgas liofilizadas (g/milhão de rotíferos)	Microalgas vivas (células/ml)
Dia 0	1-1,5	1-1,2	5000
Dia 1-6	0,5-1	0,25-3	2000-3000
(1-2 dias)			
Dia 6 (3 dia)	0,5	0,25	2000

As condições de alimentação mencionadas acima na tabela 3, são impostas caso as concentrações das microalgas sejam as apresentadas na tabela 4.

Tabela 4-Densidades celulares das microalgas para que se formule uma dieta adequada (CMC, 2013).

Microalgas congeladas (células/g)	Microalgas liofilizadas (células/g)	Microalgas vivas (células/ml)		
		<i>Nannochloropsis</i>	<i>Isochrysis</i>	<i>Rhodomonas</i>
1-1,2×10 ¹¹	1-1,6×10 ¹¹	25-30×10 ⁶	25-30×10 ⁶	3-4×10 ⁶

Depois de ter-se acesso à informação citada nas duas tabelas anteriores foram efetuados cálculos de conversão de cada uma das dietas administradas nos diferentes ensaios para que todas estivessem sob as mesmas condições de produção.

i) **RECOLHA DE AMOSTRAS**

Em todos os ensaios foram realizadas amostragens de rotíferos para determinar os seguintes parâmetros, o crescimento diário da população de rotíferos, as taxas de fertilidade e ácidos gordos.

As amostragens diárias consistiam na recolha de um volume de 100 ml para obter-se a densidade populacional e dessa forma calcularem-se os seguintes parâmetros:

- ✓ Crescimento diário da população de rotíferos;
- ✓ Taxas de fertilidade.

Fez-se também a monitorização de parâmetros ambientais da temperatura, oxigénio, pH, nitritos e amónia.

Para analisar os ácidos gordos essenciais de cada população experimental foram efetuadas amostragens ao dia 0, 3 e 4º. Para estas amostragens eram colhidos 1,5×10⁶ rotíferos para ter a quantidade de amostra necessária para as análises químicas.

Como se procedia para recolher a amostra para ácidos gordos essenciais?

- 1º Calculava-se o volume a recolher do tanque;
- 2º O volume calculado era recolhido e filtrado para uma malha de 55 µm (figura 7);



Figura 7- Filtração de rotíferos na área experimental.

3º Lavavam-se os rotíferos com água a 25 de salinidade para que estes ficassem os mais limpos possíveis (sem detritos e microalgas);

4º Voltavam-se a lavar com água destilada (processo exigido pelo laboratório de análises químicas);

5º Batia-se o crivo até que o máximo de água fosse escorrida e apenas ficassem os rotíferos retidos (figura 8);



Figura 8- Massa de rotíferos após lavagem.

6º Com o auxílio de uma seringa de 1 ml colhiam-se os rotíferos e de seguida colocavam-se dentro de um tubo tipo (Eppendorf) de 14 ml (figura 9).



Figura 9- Recolha de rotíferos com o auxílio de uma seringa, para efetuar as amostragens de ácidos gordos.

7º Todas as amostras estavam etiquetadas e eram colocadas dentro de sacos plásticos e de imediato colocadas no congelador onde ficariam armazenados a uma temperatura de - 52°C.

Na amostragem para determinação de amônia e nitritos (figura 10) foram colhidos 15 ml de meio de cultura de cada um dos tanques. Dos 15 ml recolhidos 5 ml de amostra eram usados para análise de amônia e outros 2 ml eram usados para a análise de nitritos. Estas análises eram efetuadas com os testes de colorímetro (Dr. Lange Chemicals). Estas duas análises foram realizadas apenas realizadas nas duas etapas do ensaio 3.



Figura 10- Análise de amônia e nitritos.

3.3. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE DOS ROTÍFEROS: CÁLCULOS DE CRESCIMENTO E TAXA DE FERTILIDADE

A densidade de rotíferos obtém-se através das contagens diárias dos mesmos. Em simultâneo realizam-se contagens do número de ovos. Estas contagens eram efetuadas uma vez ao dia e em triplicado. Os dados das contagens foram lançados em tabelas EXCEL 2010, com equações que permitiam obter de imediato os valores de crescimento diário e a taxa de fertilidade. A quantidade de alimento a fornecer a cada tratamento era calculada com o auxílio dos dados das contagens, pois a dieta era fornecida de acordo com percentagem da população existente no tanque.

Para efetuar os cálculos de crescimento diário e taxas de fertilidade realiza-se em primeiro lugar cálculos das médias e desvios padrões para cada um dos tanques em cada um dos tratamentos.

O crescimento diário era obtido a partir do incremento populacional resultante da média de contagens de cada tanque relativamente ao dia de cultura anterior. A taxa de fertilidade era calculada através da seguinte fórmula (CMC, 2013):

$$\text{Taxa de Fertilidade (\%)} = \frac{\text{Total de ovos} \times 100}{\text{Concentração inicial de rotíferos}}$$

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são as médias de cada tratamento e respectivos desvios padrão (média \pm desvio padrão) e as tabelas foram apresentadas em EXCEL 2010. Outras análises estatísticas foram efetuadas através do software IBM SPSS (Statistics versão 21, 2016). Com recurso a ANOVA unifatorial tendo em conta o efeito da alimentação. Através do teste Tukey HSD (Tukey-Kramer Honestly Significant Difference) foi realizada a comparação entre médias de dias, tanques e tratamentos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

4. ENSAIOS

4.1. 1º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE *B. plicatilis*, SUBMETIDO A 3 DIETAS DE CRESCIMENTO

A) OBJETIVOS

O objetivo deste ensaio foi avaliar se existiam diferenças significativas da performance dos rotíferos quando alimentados com três dietas distintas de microalgas e levedura de padeiro.

B) METODOLOGIA

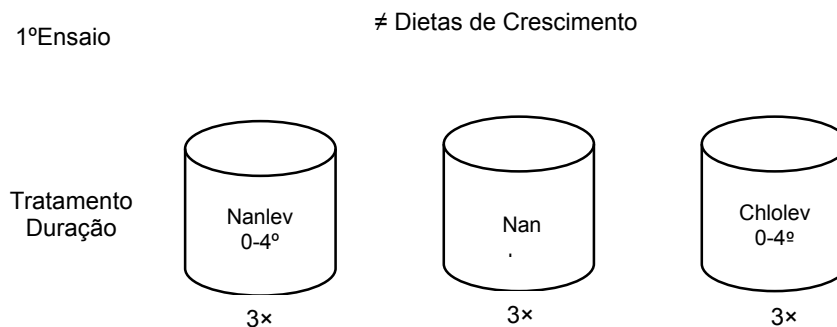
Neste ensaio foram testadas três dietas de crescimento em cultura contínua (0-4º dia).

A **Dieta Nanlev**_{Nécton} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 70% Levedura de padeiro (dieta fornecida ao grupo controlo).

A **Dieta Nanlev**_{Buggypower} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Buggypower) + 70% Levedura de padeiro (dieta fornecida ao grupo experimental EN).

A **Dieta Chlolev**_{Buggypower} = 30% *Chlorella* sp. (Buggypower) + 70% Levedura de padeiro (dieta fornecida ao grupo experimental EC).

O desenho experimental deste ensaio está descrito no esquema 1.



Variável resposta nº de indivíduos- Crescimento diário e Taxa de fertilidade

Esquema 1- Desenho experimental do 1º ensaio de crescimento. Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.

As dietas Nanlev_{Buggypower} e Chlolev_{Buggypower} foram convertidas de modo a terem o mesmo número de células por g de microalga congelada, isto porque o produto congelado *Nannochloropsis sp.* da empresa Nectón (microalga fornecida ao grupo controlo) tem 1×10^{11} células/g, enquanto que a microalga fornecida ao grupo experimental EN (*Nannochloropsis sp.* da empresa Buggypower) contem $7,42 \times 10^9$ células/g, já a microalga *Chlorella sp.* fornecida ao grupo experimental EC tem $1,29 \times 10^9$ células/g. Através destes dados foram efetuados cálculos de conversão e de seguida cálculos de proporção para ter-se sempre 30 % de microalga + 70% de levedura. Nesta experiência foram feitas duas amostragens, uma no dia 0 e outra ao 4º dia (antes do enriquecimento).

C) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 5 apresenta as médias e desvio padrão do crescimento diário dos rotíferos (indivíduos/ml), testados com a dieta Nanlev_{Nécton} (30% *Nannochloropsis sp.* (Nécton) + 70% levedura de pão), dieta Nanlev_{Buggypower} (*Nannochloropsis sp.* (Buggypower) + 70% levedura de pão) e dieta Chlolev_{Buggypower} (30% *Chlorella sp.* (Buggypower) + 70% levedura de pão), a uma temperatura (24°C), salinidade (25), pH (7,8) e Oxigénio dissolvido (6,7 mg/l).

Tabela 5- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower e a Chlolev Buggypower.

Dietas			
Dias	Nanlev Nécton	Nanlev Buggypower	Chlolev Buggypower
0	122±44,1	107±35,9	128±2,7
1	88±23,1	51±3,6	68±11,9
2	89±4,2	84±8,1	84±23,1
3	95±4,6	96±26	82±39,1
4	101±2,2	105±9	122±14,9

Após a análise de variância (ANOVA) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p= 0,548$).

O tratamento alimentado com a dieta Nanlev Nécton num volume de 5 litros tinha uma concentração inicial de 122 rotíferos/ml, a Nanlev Buggypower tinha 107 rotíferos/ml e a Chlolev Buggypower tinha 128 rotíferos/ml respectivamente. No dia 4 a primeira dieta tinha 101 rotíferos/ml, já a Nanlev Buggypower tinha 105 rotíferos/ml e Chlolev Buggypower 122 rotíferos/ml num volume de 8 litros. Estes dados mostram que os tratamentos alimentados com as três dietas após todo o manuseamento inicial acabaram por recuperar as concentrações iniciais tendo ao último dia de cultura valores de concentração muito aproximados dos iniciais.

Entre o 3 e o 4º dia de cultura o tratamento alimentado com Chlolev Buggypower mostra ter o maior incremento populacional diário observado no ensaio com um aumento percentual de 48%. Este é também o tratamento que apresenta a maior densidade populacional no último dia experimental. A *Chorella sp.*, ao ser fornecida em conjunto com a levedura de padeiro aumenta em 55% a taxa de reprodução (Bennett, 1988). De acordo com estes resultados esta seria a melhor dieta para o crescimento diário dos rotíferos, embora não existem diferenças estatisticamente significativas entre dietas.

Na tabela 6 estão representadas as médias e desvios padrão da taxa de fertilidade (%) de cada um dos três grupos experimentais do ensaio 1.

Tabela 6- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade de *B. plicatilis* com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower e a Chlolev Buggypower.

Dietas			
Dias	Nanlev Nécton	Nanlev Buggypower	Chlolev Buggypower
0	10±0,4	15±2,6	14±3,0
1	29±12,8	41±7,8	33±7,5
2	30±3,5	30±4,1	37±4,5
3	23±0,9	20±3,9	41±18,0
4	16±2,0	15±5,1	24±2,5

Neste parâmetro de performance de rotíferos, também não se verificam diferenças significativas entre tratamentos no final da experiência ($p=0,127$).

O tratamento alimentado com a dieta Nanlev Buggypower tem um decréscimo constante da taxa de fertilidade do dia 1-4, já o alimentado com Nanlev Nécton descreve um aumento entre o dia 0 e 2 diminuindo progressivamente do dia 2-4. O tratamento alimentado com Chlolev Buggypower tem um aumento progressivo da taxa de fertilidade entre os dias 0-3 diminuindo apenas a partir do dia 3. A diminuição da taxa de fertilidade está diretamente relacionada com a diminuição do número de fêmeas com ovos. Quando existe uma diminuição do número de fêmeas com ovos, pode dizer-se que a qualidade da água não é a melhor, ou até a qualidade da dieta (Orvay, 2013). Quanto menor o número de fêmeas com ovos, maior será o estado de poluição do meio (valores de amônia e nitritos, próximo do letal) e por consequência existirá mortalidade da população (Herzig, 2005). Esta pode ter sido esta uma das causas do decréscimo da taxa de fertilidade e consequentemente diminuição populacional.

Verificou-se que a taxa de fertilidade está diretamente correlacionada com o crescimento diário, ou seja, quando a taxa de fertilidade aumenta o crescimento diário também aumenta. A taxa de fertilidade têm uma correlação elevada com a densidade populacional de rotíferos nas diferentes culturas, pelo que esta pode ser usada para avaliar o potencial de crescimento da população de rotíferos.

Tanto no crescimento diário como na taxa de fertilidade o tratamento alimentado com a dieta Chlolev_{Buggypower} aparentemente apresenta uma boa performance comparativamente com os tratamentos alimentados com dietas diferentes, contudo não se pode afirmar que a dieta Chlolev_{Buggypower} é a que confere a melhor performance aos rotíferos, pois este dado não foi confirmado ao nível estatístico. Os resultados sugerem que se continuássemos a experiência, poderia haver uma diferença mais significativa entre tratamentos, no último dia de experiência.

O autor Viayeh (2015) ao fazer o estudo de rotíferos quando alimentados com diferentes microalgas (*Chlorrela*, *Nannochloropsis*, *Isochrysis*) constata que existiam diferenças significativas entre alimentos, descrevendo que a microalga *Nannochloropsis* é a que apresenta os melhores resultados de performance. Este autor obteve dados diferentes dos que se constatarem no decorrer deste ensaio, pois, neste não se obtiveram essas mesmas diferenças significativas entre tratamentos.

4.2. 2º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE *B. plicatilis*, SUBMETIDO A 6 DIETAS DISTINTAS, 3 DE CRESCIMENTO E 3 DIETAS DE ENRIQUECIMENTO

A) OBJETIVOS

O objetivo deste ensaio foi avaliar se existiam diferenças significativas da performance dos rotíferos quando alimentados com três dietas de crescimento e três dietas de enriquecimento.

B) METODOLOGIA

Este ensaio forneceu seis dietas, três de crescimento (0-3º dia) e outras três de enriquecimento (3-4º dia), ou seja, duas dietas para cada tratamento.

A **Dieta Nanlev**_{Nécton} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 70% Levedura de padeiro (dieta de crescimento fornecida ao grupo controlo).

A **Dieta Nanlev**_{Buggypower} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Buggypower) + 70% Levedura de padeiro (dieta de crescimento fornecida ao grupo experimental EN).

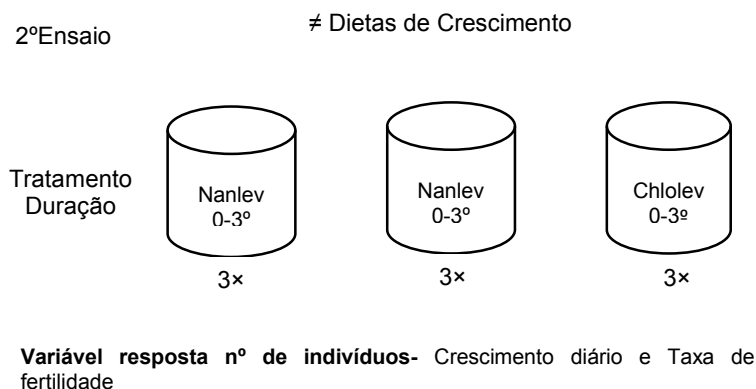
A **Dieta Chlolev**_{Buggypower} = 30% *Chlorella* sp. (Buggypower) + 70% Levedura de padeiro (dieta de crescimento fornecida ao grupo experimental EC).

A **Dieta NanIsoRho**_{CMC} = 50% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* + 10% *Rhodomonas marina* (dieta de enriquecimento fornecida ao grupo experimental C).

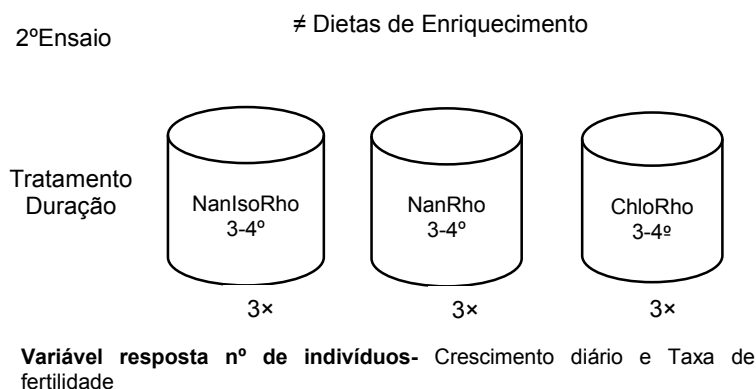
A **Dieta NanRho**_{Buggypower} = 50% *Nannochloropsis* sp. (Buggypower) + 50% *Rhodomonas salina* (Buggypower) (dieta de enriquecimento fornecida ao grupo experimental EN).

A **Dieta ChloRho**_{Buggypower} = 50% *Chlorella* sp. (Buggypower) + 50% *Rhodomonas salina* (Buggypower) (dieta de enriquecimento fornecida ao grupo experimental EC).

O desenho experimental deste ensaio está descrito no esquema 2 e 3.



Esquema 2- Desenho experimental do 2º ensaio (crescimento).
Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.



Esquema 3- Desenho experimental do 2º ensaio (enriquecimento).
Representação das 3 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.

Nesta experiência foram feitas três amostragens, uma no dia 0, outra ao 3º dia (antes do enriquecimento) e uma última após enriquecimento (4ºdia). Foram recolhidas amostras para análise de ácidos gordos.

C) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 7 apresenta as médias e desvio padrão do crescimento diário dos rotíferos (indivíduos/ml), testados com as dietas de crescimento Nanlev Nécton, dieta Nanlev Buggypower e a Chlolev Buggypower do 0-3º dia experimental. Estes tratamentos do dia 3-4º dia foram alimentados com as dietas de enriquecimento NanIsoRho CMC = 50% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* + 10% *Rhodomonas marina*, a NanRho Buggypower = 50% *Nannochloropsis* sp. + 50% *Rhodomonas salina* e a Chlolev Buggypower = 30% *Chlorella* sp. + 70% Levedura de padeiro, a uma temperatura (24°C) e salinidade (25).

Tabela 7- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower, Chlolev Buggypower e 3 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC, NanRho Buggypower, e a ChloRho Buggypower.

Dias	Dietas		
	Nanlev Nécton	Nanlev Buggypower	Chlolev Buggypower
	+	+	+
	NanIsoRho CMC	NanRho Buggypower	ChloRho Buggypower
0	99±7,7	80±9	88±2,9
1	57±4,1	56±4,2	54±1,1
2	83±4,1	69±8,9	99±13,4
3	76±4,0 ^b	64±7,2 ^c	99±3,8 ^a
4	72±6,2	63±6,2 ^b	89±11,6 ^a

Para o alimento, médias com diferente letra representam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Após a análise de variância (ANOVA) verificou-se existência de diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p=0,003$).

Ao 3º dia experimental verifica-se uma diferença significativa entre tratamentos ($p=0,002$). Neste dia constata-se que o melhor crescimento é no tratamento alimentado com a dieta Chlolev_{Buggypower}.

Entre o 3º e o 4º dia de cultura o tratamento alimentado com a dieta ChloRho_{Buggypower} mostra o maior incremento populacional diário observado na experiência aumentando a densidade de rotíferos de 88 rotíferos/ml para 89 rotíferos/ml. No decorrer da experiência teve uma quebra de 63% do 0-1º dia e do 1º até ao 4º dia descreve um aumento de 65% de densidade populacional. Também apresenta a maior densidade populacional no final da experiência, mesmo depois de ter sido feita a amostragem do 3-4º dia este tratamento descreve uma boa resposta ao manuseamento. Segundo Pouriot (1989), isto deve-se ao facto da *Chorella* sp. ser um alimento que favorece a via reprodutiva assexuada daí o tratamento ter um aumento populacional, contudo do 3-4º dia dá-se uma quebra de 11% de rotíferos/ml podendo estar na sua origem a amostragem do dia 3 e todo o manuseamento envolvido.

Do dia 3-4 nos três grupos experimentais houve mudança de dietas passando de uma dieta de crescimento para uma dieta de enriquecimento. Através da análise de variância constatou-se que existem diferenças significativas entre os tratamentos, a dieta NanRho_{Buggypower} comparativamente com a dieta ChloRho_{Buggypower} ao 4º dia ($p=0,003$), sendo a densidade populacional da ChloRho_{Buggypower} de 89 rotíferos/ml e a NanRho_{Buggypower} tinha 63 rotíferos/ml. A dieta de enriquecimento ChloRho_{Buggypower} é melhor do que a NanRho_{Buggypower}, mas não é estatisticamente diferente da dieta fornecida no CMC a NanIsoRho_{CMC} ($p > 0,05$).

Neste ensaio a melhor dieta de crescimento para o aumento da densidade populacional é a Chlolev_{Buggypower}, e a melhor dieta de enriquecimento é a ChloRho_{Buggypower}, comparativamente à dieta NanRho_{Buggypower}.

As médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos rotíferos em estudo, no decorrer do 2º ensaio, estão representados na tabela 8.

Tabela 8- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 3 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Nanlev Buggypower, Chlolev Buggypower e 3 dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC, NanRho e a ChloRho.

Dietas			
Dias	Nanlev Nécton	Nanlev Buggypower	Chlolev Buggypower
	+	+	+
	NanIsoRho CMC	NanRho Buggypower	ChloRho Buggypower
0	9±1,5	15±3,4	13±0,0
1	50±2,8	36±6,1	55±5,0
2	41±2,7	31±4,5	28±7,2
3	20±2,2	23±3,4	20±42
4	18±1,0	20±0,5	17±2,5

A taxa de fertilidade não apresenta diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p > 0,05$). Com este resultado não se pode concluir qual a melhor dieta para um incremento do ciclo reprodutivo e dessa forma para o aumento exponencial do crescimento populacional. Estes resultados acabam por ser contraditórios com os obtidos no crescimento diário mencionado acima.

O autor Alam (2004) fez um ensaio onde testou três dietas de crescimento de rotíferos *B. plicatilis*, estes foram alimentados com *Chlorrella sp.*, *Tetraselmis chui* e *Nannochloropsis oculata* e os que apresentaram melhores crescimentos e taxas de fertilidade foram os alimentados com *Tetraselmis chui* ($p < 0,05$). Este autor obteve resultados diferentes dos que se obtiveram neste ensaio, pois tal como o mencionado anteriormente neste verificou-se que a *Chlorrella sp.* confere um melhor crescimento.

4.3. 3º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO PARA AVALIAR EFEITOS DE MUDANÇA DE DIETA NA PERFORMANCE DE *B.plicatilis*

1ª ETAPA

A) OBJETIVOS

O objetivo deste ensaio foi avaliar se existiam diferenças significativas da performance dos rotíferos quando alimentados com três dietas de crescimento e três dietas de enriquecimento.

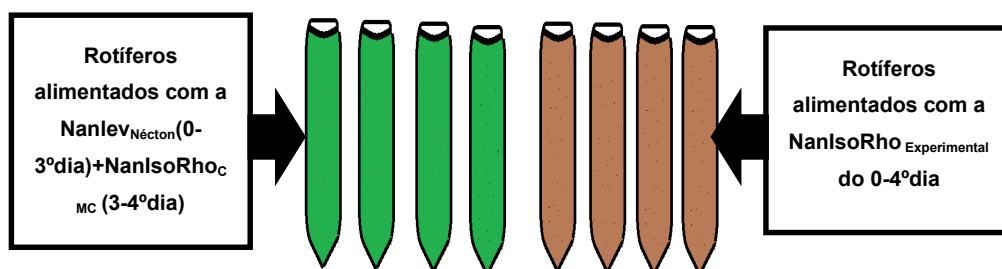
B) METODOLOGIA

Este ensaio teve duas etapas. A 1ª etapa teve duração de 5 dias (0-4º dia) e a 2ª etapa teve duração de 6 dias (0-5º dia). Neste ensaio foram testadas duas dietas de crescimento e duas de enriquecimento, tal como ilustra o esquema 4.

A **Dieta Nanlev** _{Nécton} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 70% Levedura de padeiro (dieta de crescimento fornecida ao grupo controlo do 0-3º dia).

A **Dieta NanIsoRho** _{Experimental} = 50% *Nannochloropsis oculata* (CMC) + 40% *Isochrysis galbana* (CMC) + 10% *Rhodomonas marina* (CMC) (dieta de crescimento fornecida ao grupo experimental do 0-4º dia).

A **Dieta NanIsoRho** _{CMC} = 50% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* (CMC) + 10% *Rhodomonas marina* (CMC) (dieta de crescimento fornecida ao grupo controlo do 3-4º dia).



Esquema 4- Desenho experimental da 1ª etapa do ensaio 3. Administração de duas dietas de crescimento *Nanlev Nécton*, *NanIsoRho Experimental* e duas de enriquecimento *NanIsoRho CMC* e *NanIsoRho Experimental*.

Nesta experiência foram feitas três amostragens, uma no dia 0, outra ao 3º dia (antes do enriquecimento) e uma última após enriquecimento (4º dia). Foram recolhidas amostras para análise de ácidos gordos. Também foram efetuadas amostragens para analisar-se a amónia e nitritos, ao dia 0, 3 e 4 para que se obtivessem dados sobre a

evolução da degradação da qualidade da água em cada um dos tratamentos. Estas foram feitas apenas a três tanques de cada grupo experimental.

Neste ensaio, como a dieta experimental era constituída por microalgas vivas, efetuavam-se contagens diárias de cada uma delas, para saber-se qual o volume a adicionar a cada um dos tanques de cultura de rotíferos.

C) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 9 apresenta as médias de NH_4 e de NO_2^- (mg/l), testados com as dietas de crescimento Nanlev Nécton, dieta NanIsoRho Experimental e as dietas de enriquecimento NanIsoRho CMC e a NanIsoRho Experimental do 3-4º dia experimental.

Tabela 9- Médias de NH_4 e NO_2^- obtidas após as amostragens do dia 0, 3 e 4.

Dietas	NH_4 (mg/l)	NO_2^- (mg/l)
NanlevNécton		
+	0,8	0,1
NanIsoRho _{CMC}		
NanIsoRho Experimental	0,4	0,1

Estes dados não apresentaram qualquer diferença significativa entre si ($p > 0,05$), daí ter-se calculado as médias de cada parâmetro de forma a poder-se constatar a que condições estiveram sujeitas ambas as culturas de rotíferos.

A tabela 10 apresenta as médias e desvio padrão do crescimento diário dos rotíferos (indivíduos/ml), testados com duas dietas de crescimento Nanlev Nécton e NanIsoRho Experimental e com duas dietas de enriquecimento a NanIsoRho CMC e a NanIsoRho Experimental do 0-3º dia experimental. Estes tratamentos do dia 0-4º dia foram alimentados com as dietas de crescimento NanIsoRho Experimental = 50% *Nannochloropsis oculata* (CMC) + 40% *Isochrysis galbana* + 10% *Rhodomonas marina*, e uma dieta de

enriquecimento fornecida do 3-4º dia a NanIsoRho_{CMC} = 50% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* + 10% *Rhodomonas marina*, a uma temperatura (24°C), salinidade (25), oxigénio dissolvido (6,7 mg/l) e pH (7,8).

Tabela 10- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, NanIsoRho_{Experimental} e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho_{CMC} e a NanIsoRho_{Experimental}.

Dietas		
Dias	Nanlev _{Nécton} +NanIsoRho _{CMC}	NanIsoRho _{Experimental}
0	92±1,4	92±3,3
1	107±8,0	133±15,0
2	107±15,5	91±5,0
3	105±15,4	98±15,7
4	88±16,3	68±17,2

Ao analisar-se esta etapa do ensaio 3, contactou-se a não existência de diferenças significativas no crescimento diário entre grupos experimentais ($p=0,593$). Também com esta análise soube-se que existem diferenças de crescimento consideradas estatisticamente significativas entre dias ($p < 0,05$).

Do 3-4º dia existem diferenças significativas entre dias ($p < 0,05$). O tratamento Nanlev_{Nécton} sofreu um decréscimo de 16% na densidade populacional, enquanto o tratamento NanIsoRho_{Experimental} sofreu um decréscimo de 30%. Esta diminuição pode ter a sua origem na amostragem que se fez ao 3º dia (recolha de rotíferos para análise de ácidos gordos). Após a amostragem adicionou-se um volume de água a cada tanque diluindo o número de rotíferos, o que poderá ter afectado a população. Além disso, também entre estes dois dias dá-se a mudança de dieta do tratamento Nanlev_{Nécton}.

passando os rotíferos a serem alimentados com a dieta de enriquecimento (duração de 24 horas) a NanIsoRho_{CMC}.

O tratamento alimentado com a dieta Nanlev_{Nécton}+NanIsoRho_{CMC} acaba por finalizar esta etapa com um número de rotíferos aproximados à densidade populacional inicial (88 rotíferos/ml), tendo apenas um decréscimo de 4%, já o tratamento alimentado com a mesma dieta do dia 0-4 (NanIsoRho_{Experimental}) acaba por ter uma diminuição de 26%.

As médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos rotíferos em estudo no decorrer do 3º ensaio (1ª etapa) estão representados na tabela 11.

Tabela 11- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev_{Nécton}, NanIsoRho_{Experimental} e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho_{CMC} e a NanIsoRho_{Experimental}.

Dietas		
Dias	Nanlev _{Nécton} + NanIsoRho _{CMC}	NanIsoRho _{Experimental}
0	10±0,36	10±0,9
1	37±4,4	23±2,9
2	37±6,8	42±13,7
3	37±5,3	32±4,5
4	36±7,6	33±5,4

Após a análise de variância (ANOVA), verificou-se que não existe diferenças significativas de taxas de fertilidade entre tratamentos.

A dieta do grupo experimental (NanIsoRho_{experimental}) é um mix de microalgas e este fomenta a produção de fêmeas amícticas (Pourriot, 1989). Com o auxílio desta análise descritiva percebe-se que ambas as dietas favorecem o ciclo reprodutivo do rotífero em

estudo, contudo, pois, vão aumentando o número de fêmeas com ovos, embora não mostre ter diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos.

Segundo os autores Walczyńska e o Jing (2014), os rotíferos cultivados a uma temperatura de 25°C com diferentes dietas apresentam diferenças significativas de performances. O ensaio 3 (1ª etapa) tem resultados opostos aos que o autor menciona, mesmo estes rotíferos tendo sido cultivados sob condições abióticas idênticas.

Ácidos Gordos

Ao fazerem-se as análises químicas do 3º ensaio, teve-se de juntar as quatro amostras de cada tratamento, devido à falta de material para análise química. Este procedimento deu origem à falta de dados para poder fazer-se o tratamento estatístico, pois, o n < 3. Os dados foram tratados de forma percentual através da fórmula:

$$\% = \left(\frac{\text{valor final} - \text{valor inicial}}{\text{valor inicial}} \right) * 100$$

Os AGE foram analisados através de 3 amostragens, sendo a 1ª correspondente ao dia 0, a 2ª correspondente ao dia 3 e a 3ª amostragem correspondente ao dia 4. Obtiveram-se os resultados mencionados no conjunto de gráficos ilustrados no gráfico 1.

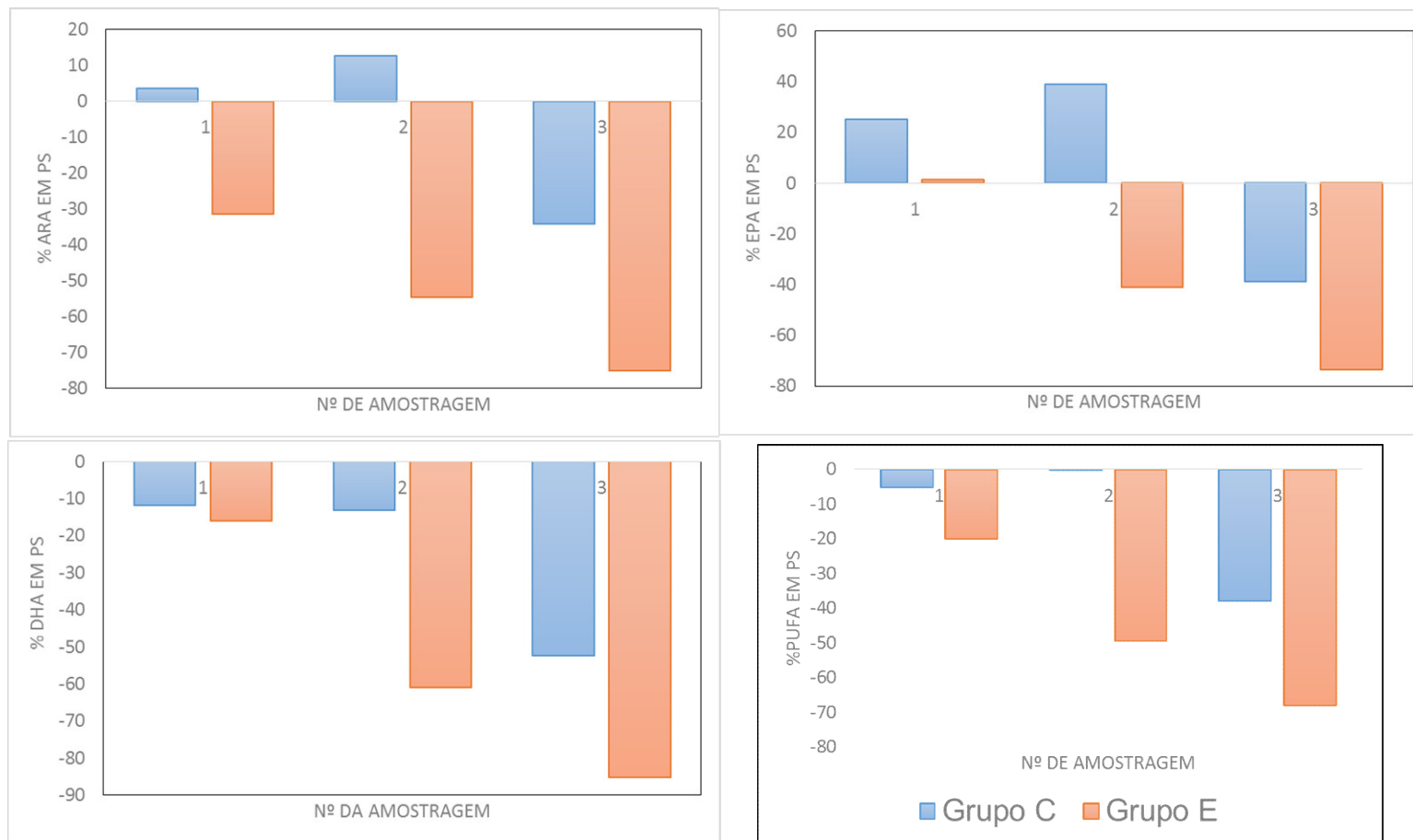


Gráfico 1- Canto superior esquerdo (%ARA), canto superior direito (%EPA) canto inferior esquerdo (%DHA) e canto interior direito (%PUFA). Análise de ácidos gordos essenciais de ambos os tratamentos.

Relativamente ao ácido ariquidónico (ARA) verifica-se que o tratamento alimentado com a dieta Nanlev_{Nécton} contém uma percentagem superior na 1ª (dia 0) e 2ª (dia 3) amostragem, já na 3ª amostragem após enriquecimento (NanIsoRho_{CMC}) dá-se uma quebra de 41%. O ARA é importante pois auxilia na produção de prostaglandinas (Bransden, 2004). O tratamento alimentado com a dieta NanIsoRho_{CMC} descreve um decréscimo constante de ARA, o que mostra que a dieta não é rica em ARA.

O EPA também tem maior percentagem no tratamento alimentado com a dieta de crescimento Nanlev_{Nécton} (1 e 2ª amostragem). Ao fazer-se a alteração de dieta para uma de enriquecimento o gráfico do EPA mostra que a dieta NanIsoRho_{CMC}, tal como a dieta experimental NanIsoRho_{Experimental} fazem baixar os níveis deste AGE, o que não será favorável ao bom desenvolvimento larvar. Contudo estes dados dão uma indicação preliminar, mas não deixam tirar uma conclusão definitiva de qual seria a dieta com melhor percentagem em EPA para ser fornecida às larvas de peixe, isto porque não podemos fazer a análise estatística.

Em relação ao DHA ambas as dietas não são ricas neste ácido e assim sendo estas não são as mais favoráveis. Este AGE está presente em grandes quantidades no cérebro e retina das larvas de peixes marinhos. O défice de DHA suscita a possibilidade de malformações no olho provocando dessa forma a falta de visibilidade e devido a este fator a não captura/ingestão do alimento vivo podendo assim dar origem a elevadas taxas de mortalidade larvar (Ferreira, 2009).

O gráfico dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA) mostra que ambas as dietas não são ricas em AGE e dessa forma devem ser efetuados novos ensaios para testar o prolongamento do ensaio. O enriquecimento das dietas com diferentes microalgas e produtos comerciais, favorecerá a adição de AGE aos rotíferos.

2ª ETAPA

A) OBJETIVOS

Esta 2ª etapa do ensaio 3 teve por objetivo verificar em primeiro lugar, se existe resposta significativa da performance dos rotíferos a uma mudança de dieta. Em segundo lugar, avaliar se a dieta aplicada na fase anterior pode ter alguma influência significativa na resposta dos rotíferos (ao nível de ácidos gordos) à mudança de dieta.

B) METODOLOGIA

Os volumes de cada tanque desta 2ª etapa do 3º ensaio foram constituídos pelo volume que sobrou de cada um dos grupos experimentais após a amostragem do quarto dia. A segunda etapa iniciou-se com um volume de 3 litros.

Os 4 tanques de cada tratamento foram desdobrados em 12 tanques. Três tanques do grupo CC + 3 do grupo CE (provenientes do grupo C da 1ª etapa) + 3 do grupo EC + 3 do grupo EE (provenientes do grupo E), tal como ilustra a figura 11.

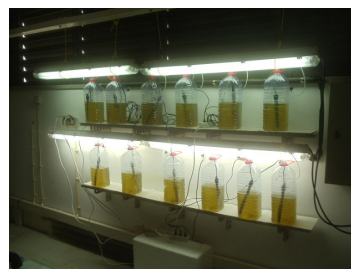
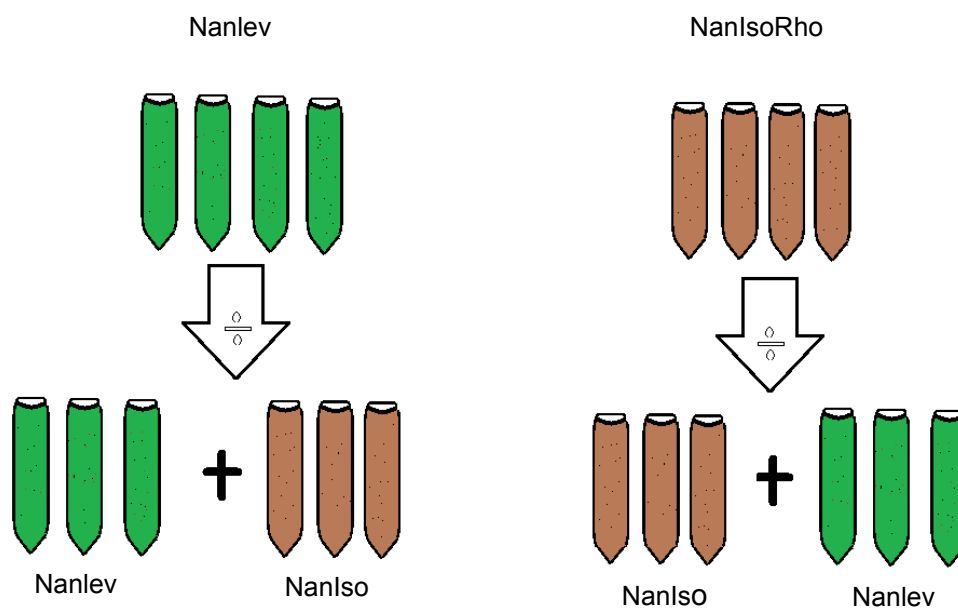


Figura 11- Segunda etapa do 3º ensaio ao dia 0.

As dietas fornecidas aos seis grupos experimentais foram as mesmas do que as da 1ª etapa deste ensaio.

Os grupos CC e EC foram alimentados com a dieta Nanlev_{Nécton} e os grupos EE e CE foram alimentados com a dieta rica em microalgas vivas (NanIsoRho_{Experimental}). O esquema 5 ilustra do desenho experimental desta etapa.



Esquema 5- Desenho experimental da 2ª etapa do ensaio 3.

No decorrer destes seis dias experimentais foram efetuadas recolhas de amostras diariamente, para fazer-se a contagem e monitorização (figura 12) de cada um dos tanques.



Figura 12- Monitorizações diárias dos parâmetros da água.

Foram realizadas amostragens ao dia 0 e ao 5 dia para a análise de ácidos gordos essenciais. Também nestes dias experimentais fizeram-se recolhas de amostra de cada um dos 12 tanques experimentais para analisar a amónia e os nitritos.

Nesta 2ª etapa como a dieta experimental era constituída por microalgas vivas, efetuavam-se contagens diárias de cada uma das microalgas, para saber-se qual o volume de microalgas a adicionar a cada um dos tanques de cultura.

Todo o ensaio 3 difere dos restantes quatro ensaios, pelo seu tratamento experimental (NanIsoRho Experimental), pois neste ensaio os rotíferos foram alimentados

apenas com microalgas (vivas) normalmente usada em dietas de enriquecimento, mas no caso foram fornecidas continuamente (0-5º dia).

C) RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 13 apresenta as médias e desvio padrão do crescimento diário dos rotíferos (indivíduos/ml), testados com duas dietas de crescimento Nanlev Nécton e NanIsoRho Experimental do 0-5º dia experimental, a uma temperatura (24°C), salinidade (25), oxigênio dissolvido (6,7 mg/l) e pH (7,8).

Tabela 12- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 6 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton e a NanIsoRho Experimental houve um cruzamento de dietas.

Grupos experimentais				
Dias	CC	CE	EC	EE
0	50±0,6	50±1,2	50±0,3	50±0,4
1	66±13,1	62±9,9	66±11,9	69±6,1
2	81±6,0	66±4,7	62±11,1	68±9,1
3	98±16,3	73±8,5	69±12,6	78±13,6
4	114±44,0	78±14,4	79±4,5	96±6,0
5	115±19,2	86±1,1	73±2,5	91±14,4

Após a análise de variância (ANOVA) verificou-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p > 0,05$).

Como não existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, fez-se o estudo através da análise percentual de como oscilam os tratamentos ao longo do período experimental.

O tratamento que se destaca por ter o maior número de rotíferos é o CC (alimentado com Nanlev Nécton), que tem no último dia experimental 115 rotíferos/ml e o segundo tratamento com maior densidade populacional é o EE (alimentado com NanIsoRho Experimental), em que se obteve ao 5º dia 91 rotíferos/ml. O grupo CC tem um aumento percentual do 0-5º dia de 130% já o grupo EE no mesmo dia de ensaio tem 82% de aumento da densidade populacional. Desta forma pode dizer-se que o facto de fornecer uma nova dieta ao dia 0 desta 2ª etapa não afecta o crescimento dos rotíferos. Os rotíferos crescem melhor com as dietas que já vinham a ser alimentados desde a 1ª etapa deste ensaio. No entanto ao nível estatístico não se obteve diferenças significativas.

As médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos rotíferos em estudo, no decorrer do 3º ensaio 2ª etapa estão representados na tabela 13.

Tabela 13- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade de *B. plicatilis* (%) com duração experimental de 6 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton e a NanIsoRho Experimental houve um cruzamento de dietas.

Grupos experimentais				
Dias	CC	CE	EC	EE
0	17±0,20	21±0,51	22±0,1	17±0,1
1	15±3,6	18,0±2,1	19±1,4	13±0,6
2	32±2,0	21±2,3	22±4,7	32±5,8
3	30±10,1	27±3,4	18±2,3	34±0,9
4	32±17,6	24±4,6	20±1,7	23±7,7
5	21±7,4	23±6,7	22±4,0	16±1,5

A taxa de fertilidade não apresenta diferenças estatísticas entre tratamentos ($p < 0,05$).

Na taxa de fertilidade verifica-se o contrário do crescimento diário, Os grupos CC e EE apresentam valores ligeiramente inferiores aos dos grupos experimentais CE e EC. Na 1ª etapa o CE era alimentado com Nanlev Nécton e o EC era alimentado com

NanIsoRho_{Experimental}, já na 2ª etapa houve cruzamento de dietas e o grupo CE foi alimentado com NanIsoRho_{Experimental} e o EC foi alimentado com Nanlev_{Nécton}.

O grupo CE é o que apresenta um valor de taxa de fertilidade superior comparativamente com os outros quatro grupos experimentais, demonstrando que a mudança de meio e uma dieta cruzada favorece o aumento do número de fêmeas com ovos, podendo assim prolongar-se o crescimento de rotíferos em grandes volumes.

4.4. 4º ENSAIO: ENSAIO DE CRESCIMENTO DE *B. plicatilis*, SUBMETIDO A 2 DIETAS DE CRESCIMENTO E 2 DIETAS DE ENRIQUECIMENTO

A) OBJETIVOS

O objetivo deste ensaio foi avaliar se existiam diferenças significativas da performance dos rotíferos quando alimentados com duas dietas de crescimento e duas dietas de enriquecimento.

B) METODOLOGIA

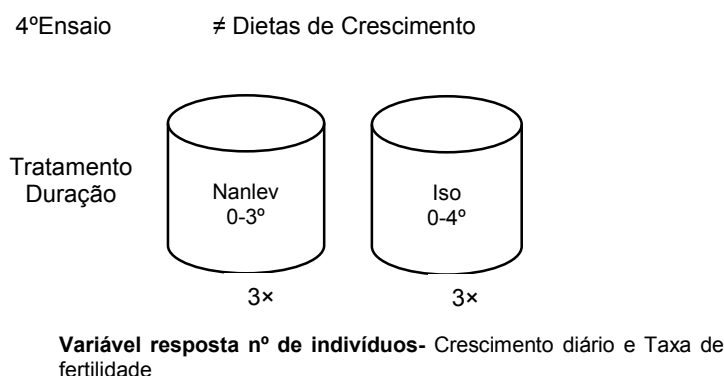
Este ensaio forneceu três dietas, duas de crescimento (0-3º dia) e uma de enriquecimento (3-4º dia).

A **Dieta Nanlev**_{Nécton} = 30% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 70% Levedura de padeiro (dieta de crescimento fornecida ao grupo controlo do 0-3º dia).

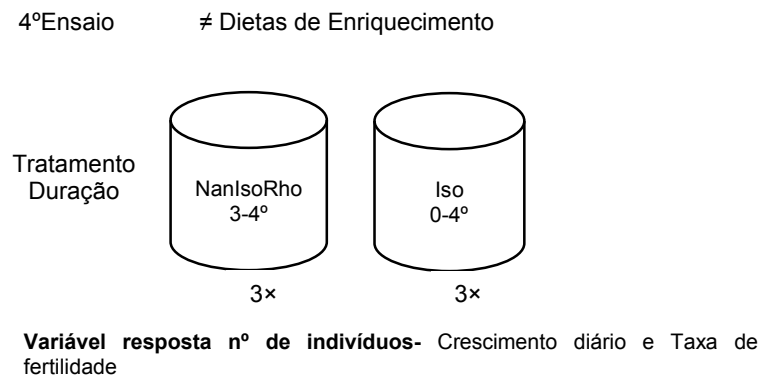
A **Dieta Iso** = 100% *Isochrysis galbana* (CMC) (dieta de crescimento e enriquecimento fornecida ao grupo experimental dos 0-4º dia).

A **Dieta NanIsoRho**_{CMC} = 50% *Nannochloropsis* sp. (Nécton) + 40% *Isochrysis galbana* (CMC) + 10% *Rhodomonas marina* (CMC) (dieta de enriquecimento fornecida ao grupo controlo dos 3-4º dia).

O desenho experimental deste ensaio está descrito no esquema 6 e 7.



Esquema 6- Desenho experimental do 4º ensaio (crescimento).
Representação das 2 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.



Esquema 7- Desenho experimental do 4º ensaio (enriquecimento).
Representação das 2 dietas, duração do ensaio e variáveis a analisar.

O quarto ensaio diferiu dos outros no tipo de dieta experimental, uma vez que foi usada a microalga (viva) *Isochrysis galbana*, espécie empregue para enriquecimento.

Como se trabalhou com uma microalga viva eram efetuadas contagens diárias do número de células existentes, de forma a determinar a sua densidade e avaliar o volume de cultura desta espécie a adicionar aos tanques experimentais.

C) RESULTADOS

A tabela 14 apresenta as médias e desvio padrão do crescimento diário dos rotíferos (indivíduos/ml), testados com duas dietas de crescimento Nanlev_{Nécton} (0-3º dia) e a Iso (0-4ºdia) e duas dietas de enriquecimento a NanIsoRho_{CMC} (3-4º dia) e a Iso (0-4ºdia), a uma temperatura (24°C), salinidade (25), oxigénio dissolvido (6,7 mg/l) e pH (7,8).

Tabela 14- Médias e desvio padrão do crescimento diário de *B. plicatilis* (rotíferos/ml) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev Nécton, Iso e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho_{CMC} e a Iso.

Dietas		
Dias	Nanlev _{Nécton} +NanIsoRho _{CMC}	Iso
0	184±4,5	181±15,2
1	124±12,0	135±17,0
2	87±8,0	88±18,0
3	107±20,0	68±13,1
4	85±5,5	68±5,2

Após a análise de variância (ANOVA) verificou-se existência de diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ($p>0,05$).

A dieta Nanlev_{Nécton} + NanIsoRho_{CMC} tem valores que aparentam ser favoráveis ao crescimento diário de rotíferos, contudo não se pode afirmar que é a melhor, pois também neste ensaio não existem diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos, nem do 3º para o 4º dia.

Ao fazer esta análise descritiva sabe-se que apesar de se fazer uma amostragem do 3-4º dia de ambos os tratamentos, rotíferos alimentados com a dieta NanIsoRho_{CMC} sofrem uma quebra de densidade populacional, já os alimentados com a dieta Iso mantém a densidade populacional. Este facto leva a dizer que se deveria dar continuidade à experiência para verificar se com o passar dos dias ou tratamentos seriam diferentes entre si.

As médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos rotíferos em estudo no decorrer do 4º ensaio estão representados na tabela 15.

Tabela 15- Médias e desvio padrão da taxa de fertilidade dos *B. plicatilis* (%) com duração experimental de 5 dias. Foram testadas 2 dietas de crescimento a Nanlev_{Nécton}, Iso e 2 dietas de enriquecimento a NanIsoRho_{CMC} e a Iso.

Dietas		
Dias	Nanlev _{Nécton} +NanIsoRho _{CMC}	Iso
0	11±0,8	12±2,1
1	26±3,2 ^a	16±2,3 ^b
2	34±2,4 ^a	16±2,9 ^b
3	21±3,9	19±4,7
4	22±1,4	19±2,5

Para o alimento, médias com diferente letra representam valores significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

Após a análise de variância (ANOVA) verificou-se existência de diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos ao 1 e 2º dia ($p=0,03$).

Analisando a tabela o tratamento alimentado com Nanlev_{Nécton} apresenta ter uma melhor taxa de fertilidade comparativamente aos rotíferos alimentados com a dieta Iso. Este facto está associado ao facto de uma dieta apenas com uma microalga viva não ser o suficiente para o incremento do ciclo reprodutivo e posterior aumento populacional, embora a constatação deste facto seja apenas no 1 e 2º dia.

A mudança de dieta na população de rotíferos alimentados com Nanlev_{Nécton} e enriquecidos do 3-4º de ensaio NanIsoRho_{CMC} mostra ser favorável, porque apesar de se ter feito a amostragem os rotíferos mantiveram ou até mesmo aumentaram o número de fêmeas com ovos. Isto poderá ser relacionado com o facto de se retirar meio e adicionar água a cada tanque tornando assim o meio mais limpo, o mesmo aconteceu com o tratamento alimentado com a dieta Iso.

Estes resultados foram diferentes dos apresentados por Korstad (1989), pois este autor obteve melhores resultados de performance de rotíferos alimentados com a *Isochrysis galbana* do que os alimentados com a microalga *Nannochloropsis* sp. ($P < 0,05$), contudo as condições deste ensaio eram 20°C e 20 de salinidade. As condições deste ensaio eram diferentes das seguidas neste ensaio.

Suchar (2006) teve diferenças estatisticamente significativas tanto no crescimento diário como na taxa de fertilidade dos rotíferos alimentados com diferentes dietas baseadas em *Nannochloropsis oculata* e *Isochrysis galbana*. Mais uma vez estes resultados diferem dos obtidos neste 4º ensaio, pois o que se conclui é que apenas existe uma ligeira diferença entre o tratamento Nanlev_{Nécton} e o Iso no crescimento diário.

5. CONCLUSÕES

Para assegurar uma melhor performance de *Brachionus plicatilis* (crescimento diário e taxa de fertilidade) a salinidade deve ser de 20 e a temperatura entre 22-25°C.

Em relação ao alimento fornecido aos rotíferos deve ser composto por microalgas (vivas, congeladas ou liofilizadas) e levedura de padeiro. Como os rotíferos não têm a quantidade de ácidos gordos essenciais para satisfazerem as necessidades das larvas de peixes marinhos, então deve-se enriquece-los com produtos que lhes confirmem os ácidos gordos polinsaturados (DHA e EPA) para que os rotíferos ao serem ingeridos pelas larvas forneçam os nutrientes adequados ao bom desenvolvimento larvar.

O enriquecimento/bioencapsulação com microalgas deve ser feito quando as concentrações de rotíferos são bastante elevadas (1500 rotíferos/ml) e deve ter uma duração de pelo menos 24 horas para que os rotíferos incorporem os ácidos gordos essenciais (Ferreira, 2009).

As análises químicas feitas aos rotíferos descrevem a sua composição e por sua vez esta deverá ser refletida na qualidade das larvas de peixes marinhos.

Em resumo a realização destes ensaios permite as conclusões seguintes:

- ✓ A dieta Chlolev_{Buggypower} (30% *Chlorella sp.*+70 levedura de padeiro) apresenta um melhor crescimento diário do que a dieta Nanlev_{Buggypower} (30% *Nannochloropsis sp.* (Buggypower) + 70 levedura de padeiro) ($p=0,03$), o que nos leva a dizer que a Chlolev_{Buggypower} é melhor do que a Nanlev_{Buggypower}, porém não é melhor do que a Nanlev_{Nécton} (30% *Nannochloropsis sp.* (Nécton) +70 levedura de padeiro) ($p>0,05$).
- ✓ A dieta Nanlev_{Nécton} (30% *Nannochloropsis sp.* (Nécton) +70 levedura de padeiro) comparativamente com a dieta Iso (100% *Isochrysis galbana*), não apresenta um crescimento diário estatisticamente diferente entre si, já em relação à taxa de fertilidade a dieta produzida no CMC (Nanlev_{Nécton}) mostra ter o maior número de fêmeas com ovos ($p=0,003$).

Com o elaborar destes quatro ensaios foram surgindo novas ideias para novos estudos como por exemplo:

- ✓ Prolongar os ensaios por mais 4 dias além dos testados, de forma a constatar se existiriam diferenças significativas na performance dos rotíferos e no perfil dos seus ácidos gordos essenciais;
- ✓ Testar apenas uma dieta de crescimento com duas dietas de enriquecimento, com o objetivo de perceber qual a melhor e a que contém o melhor perfil de AGE;
- ✓ Oscilar as condições do meio em que os rotíferos estão inseridos de forma a encontrar o local de cultivo ideal;
- ✓ Fazer ensaios em larga escala com temperaturas baixa, de modo a testar a possibilidade de se poderem conservar *stocks* de rotíferos.

6. REFERÊNCIAS

- Alam, M. J., Shah, M. M. R. (2004). Growth and reproductive performance of locally isolated brackishwater rotifer (*Brachionua plicatilis*) feeding on different microalgae. *Journal Fish Research*, 8(2), 127-133.
- Allan, G., Burnell, G. (2013). Advances in aquaculture hatchery technology (W. Publishing Ed.), 1.
- Azemar, F., Boulêtreau, S., Lionard, M., Muylaert, K., Vyverman, W., Meire, P., Tackx, M. (2006). Looking for general trends in trophic interactions among estuarine micro- and mesozooplankton. *Journal Plankton Research*, 29 (1), 1-29.
- Bennett, W., Boraas, M. E. (1988). Isolation of a fast-growing strain oh the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas using turbidostat culture. *Aquaculture*, 73, 27-36.
- Brandsen, M.P., Coberoft, J.M., Battaglione, S.C., Dunstan, G. A., Nichoes, P.D., Bell, J.G. (2004). Dietary arachidonic acid alters tissue fatty acid profile, whole body eicosanoid production and resistance to hypersaline challenge in larvae of the temperate marine fish, striped trumpeter (*Latris lineata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 30, 241-256.
- Bessonart, M., Izquierdo, M.S., Salhi, M., Hernandez-Cruz, C.M., Gonzalez, M.M., Fernandez-Palacios, H. (1999). Effect of dietary arachidonic acid levels on growth and survival of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae. *Aquaculture*, 179(1-4), 265–275.
- Cabrera, T., Bae, J. H., Bai, H. B., Hur, S. B. (2005). Effects of Microalgae and salinity on the growth of three types of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 8, 70-75.
- CMC. (2013). Protocolos de Produção de Alimentos vivos do Centro de Maricultura da Calheta.
- Costa, W. (2008). Crescimento populacional de rotíferos *Brachionus plicatilis* Müller, 1786, alimentados com microalgas. *Brazilian Journal of Agricultural Sciences*, 3, 2.
- Cruz, F., Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., C. Trees, C., Santamaría-del-Ángel, E., Núñez-Cebrero, F. (2006). Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (*Cryptophyceae*) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural Engineering*, 35, 51-60.
- Dhert, P., Rombaut, G., Suantika, G., Sorgeloos, P. (2001). Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200, 129–146.
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO. (2015). Relatório destaca o crescente papel do peixe na alimentação mundial. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.

- FAO. (2016a). Fisheries and Aquaculture Department. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO. (2016b). La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- Fernández-Reiriz, M. J., Perez-Camacho, A., Ferreiro, M. J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M. J., Labarta U. (1989). Biomass Production and Variation in the Biochemical Profile (Total Protein, Carbohydrates, RNA, Lipids and Fatty Acids) of Seven Species of Marine Microalgae. *Aquaculture*, 83, 17-37.
- Ferreira, L. (2014). Identificação e Desenvolvimento Larvar de Peixes Tropicais do Indo Pacífico no Oceanário de Lisboa. *Universidade do Porto*.
- Ferreira, P. (2009). Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. *IPIMAR*.
- Fórumpeixe. (2016). Rotíferos zooplâncton-*Brachionus plicatilis*. *Fórum peixe*.
- Hansen, B., Wernberg-Møller, T., Wittrup, L.(1997). Particle grazing efficiency and specific growth efficiency of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 215, 217–233.
- Herzig, A., Gulati, R. D., Jersabek, C. D., May, L. (2005). *Rotifera X* (Springer Ed.), 181.*Developments in Hydrobiology*.
- INE. (2014). Estatísticas da Pesca 2014. *Instituto Nacional de Estatística*.
- Izquierdo, M. S. (2005). Essential fatty acid requirements in Mediterranean fish species. *Cahiers Options Méditerranéennes*, 63, 91-102.
- Jing, D., Yehui, Y., Yingying, Z., Kanyun, W., Haiyu, G., Lin, L. (2014). Effects of temperature and food on population growth and reproduction of rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 4, 009.
- Kaiser, J. M., Attrill, J. M. (2011). Marine ecology processes, systems and impacts (O. U. Press Ed.).
- Korstad, J., Olsen, Y., Vadstein, O. (1989). Life history characteristics of *Brachionus plicatilis* (Rotifera) fed different microalgae. In *Rotifer Symposium V* , 43-50. Springer Netherlands.
- Koven, W. M., Tandler, A., Kissil, G. W., Sklan, D. (1992). The importance on n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture*, 104 (1-2), 91-104.
- Lavens, P., Sorgeloos, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for *Aquaculture* (FAO Ed.), 1-10.
- Lawson, B. T. (1995). Fundamentals of Aquacultural Engineering (USA Ed.), 1-355.

- Lopes, A. (2010). Comportamento alimentares de *Brachionus* sp.: microalgas vivas e liofilizadas e emulsões de produtos comerciais. -Taxa de crescimento e análise de conteúdos lipídicos. *Universidade de Lisboa*.
- Lowe, C. D., Kemp, S. J., Bates, A. D., Montagnes, D. J. S. (2005). Evidence that the rotifer *Brachionus plicatilis* is not an osmoconformer. *Marine Biology*, 146, 923-929.
- Lubzens, E., Gibson, O., Zmora, O., Sukenik, A. (1995). Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. *Aquaculture*, 133, 295-309.
- Lubzens, E., Zmora, O. (2003). Production and nutritional value of rotifers . In *Live feeds in Marine Aquaculture* (Lubzens, J., G., McEvoy, L., A., Eds), 17-52. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Lucas, J. S., Southgate P. C. (2012). *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*. John Wiley e Sons.
- Lund, I., Steenfeldt, S. J., Banta, G., Hansen, B. W. (2008). The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea*). *Aquaculture*, 276, 143–153.
- Moretti, A., Fernandez-Criado, M.P., Cittolin, G., Guidastri, R. (1999). Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. *FAO*, 1.
- Murgas, S. D. L., Drumond, M. M., Pereira, M. J. G., Felizardo, O. V. (2009). Manipulação do ciclo e da eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. *Revista Brasileira de Reprodução Animal, Supl*, 70-76.
- ONUBR. (2014). *FAO: Pesca e aquicultura batem recorde de produção em 2013. ONUBR*.
- Paula, A., Santos F., Santos L., Galvez, A. (1994). Análise do crescimento populacional do rotífero *Brachionus plicatilis* alimentados com microalga *Dunaliella salina*. *Trends in Biotechnology*, 8, 121-126.
- Planas, M., Cunha, I. (1999). Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177, 171–190.
- Poisson, L., Ergon, F. (2001). Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. *Journal Biotechnology*, 91(1), 75–81.
- Pourriot, R. (1989). Les Rotifères-Biologie. In *Aquaculture*, 1, 202-221, Lavoisier, Paris.
- Queiroz, J., Boeira, R. (2007). Boas Práticas de Manejo (BPMs) para Reduzir o Acúmulo de Amônia em Viveiros de Aquicultura. *Comunicado Técnico nº44*.
- Rainuzzo, J. R., Reitan, K. I., Olsen, Y. (1997). The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155, 103-115.

- Richmond, A. (2004). Biological principles of mass cultivation. In Handbook of Microalgal Culture: *Biotechnology and Applied Phycology* (Amos Richmond Ed.), 125-177. Blackwell Science Ltd, Iowa USA.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., R., Tredici M. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(1), 100–112.
- Sánchez, S., Martínez, M., Espinola, F. (2000). Biomass production and biochemical variability of the marine microalga *Isochrysis galbana* in relation to culture medium. *Biochemical Engineering Journal*, 6(1), 13-18.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D., Estevez, A. (1999). Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177(1-4), 191-199.
- Sargent, J. R., Tocher, D. R., Bell, J. G. (2002). Fish nutrition. *The lipids*, 182-257.
- Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M., Otero, A. (2009). Nutritional value of the cryptophyte *Rhodomonas lens* for *Artemia sp.*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 381(1), 1-9.
- Shields, R. J. (2001). Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*, 200(1-2), 55-88.
- Suchar, V. A., Chigbu, P. (2006). The effects of microalgae species and densities on the population growth of the marine rotifer, *Colurella dicentra*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 337(1), 96-102.
- TecnoAlimentar. (2015). Aquacultura em Portugal: um setor em crescimento. *Revista TecnoAlimentar*.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. Reviews in *Fisheries Science*, 11(2), 107-184.
- Viayeh, R. M., Mohammadi, H. (2012). An experimental study on food and salinity preferences of two *Brachionus plicatilis* rotifer strains from Iran. *African Journal of Aquatic Science*, 37 (1), 101-106.
- Vijayagopal, P., Chakraborty, K., Iyyapparajanarasimapallavan, G., Anill, M. K., Ignatius, B., Correya, N. S., Vijayan, K. K. (2012). Development of live feed enrichment product for marine fish larviculture. *Indian Journal Fish*, 59, 121-125.
- Walczyńska, A., Serra, M. (2014). Inter-and intraspecific relationships between performance and temperature in a cryptic species complex of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, 734(1), 17-26.
- WoRMS. (2015). *Brachionus plicatilis* Muller, 1786. *World Register of Marine Species*.

- Yúfera, M. (2001). Studies on *Brachionus* (Rotifera): an example of interaction between fundamental and applied research. *Hydrobiologia*, 446(1), 383.
- Zambonino, J. L., Cahu, C. L. (2010). Effect of nutrition on marine fish development and quality. *Aquaculture*, 1, 103-124.

**Ensaio com os rotíferos *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786),
submetidos a diferentes dietas de crescimento** Lia Gomes da
Vanessa Marina Ferreira Marujo

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

